Podstawy biologii komórki

Wprowadzenie do biologii molekularnej

Bruce Alberts
Dennis Bray
Alexander Johnson
Julian Lewis
Martin Raff
Keith Roberts
Peter Walter

Podstawy biologii komórki

Wprowadzenie do biologii molekularnej

Bruce Alberts
Dennis Bray
Alexander Johnson
Julian Lewis
Martin Raff
Keith Roberts
Peter Walter

przekład pod redakcją
Jana Michejdy
i Jacka Augustyniaka

Wydawnictwo
Naukowe
PWN
Warszawa
1999

Przedmowa

Co to znaczy być wykształconym?
Pytanie o to, jaki powinien być zakres istotnej wiedzy przekazywanej studentom, wywołuje gorące dyskusje już od początku istnienia instytucji edukacyjnych. U progu XXI wieku w zakres ten powinna bezwzględnie wchodzić podstawowa znajomość komórki jako jednostki życia. Rewolucyjny postęp, który nastąpił w ostatnich 50 latach, dotyczący wiedzy o oddziaływaniach komórki, jest jednym z wielkich tryumfów odkryć ludzkich.

Możemy obecnie wyjaśnić umożliwiające życie procesy chemiczne, które pozwalają nam się poruszać, myśleć, mówić i kontaktować się z otaczającym światem. Nauczyliśmy się śledzić pochodzenie każdej z dużych cząsteczek znajdujących się w naszych komórkach, badając inne organizmy mające takie same cząsteczki. Nareszcie doceniamy, kim jesteśmy na tle innych istot żywych. Nowa wiedza wniosła również wiele praktycznych korzyści, umożliwiając odkrycia biologiczne o dużym znaczeniu dla naszego zdrowia i rozwoju ludzkości. Genetyczne testy zdrowotne, inżynieria genetyczna żywności, wprowadzanie nowych leków, używanie „odcisków" DNA w postępowaniu sądowym oraz zrównoważenie zagrożeń środowiska i czerpanych z niego korzyści — to niektóre problemy mające ścisły związek z biologią, z którymi musimy się dziś zmierzyć. Stosowanie z korzyścią tego nowego bogactwa wiedzy w nadchodzącym wieku będzie wymagać podejmowania wielu trudnych decyzji przez ludzi mających lokalną władzę, którzy powinni w tym celu znać podstawy biologii komórki.

Toteż celem przyświecającym pisaniu tej książki było dostarczenie prostych wyjaśnień działania żywej komórki. Przez „działanie" rozumiemy w zasadzie sposób, w jaki cząsteczki — zwłaszcza białka, DNA i RNA — współpracują w komórce tworząc system, który odżywia się, porusza, reaguje na bodźce i rozmnaża się — czyli po prostu jest żywy. Przez „proste" rozumiemy taki sposób przedstawiania tematu, który byłby łatwo zrozumiany przez słuchaczy pierwszych lat studiów nie mających większego przygotowania w zakresie biologii. Potrzebę krótkiego, przejrzystego przeglądu istotnych zagadnień biologii komórki doceniliśmy już pisząc *Biologię molekularną komórki**, której trzecie wydanie przygotowujemy obecnie, przeznaczoną dla zaawansowanych słuchaczy biologii oraz medycyny, i oczywiście zbyt specjalistyczną i trudną dla wielu studentów potrzebujących ogólnej wiedzy o biologii komórki.

Początkowy zamiar napisania uproszczonej wersji *Biologii molekularnej komórki* przez jej proste skrócenie okazał się niewykonalny. Boleśnie odczuliśmy prawdę, że napisanie tekstów w zakresie początkowym wymaga zupełnie nowego podejścia i że „lepić trzeba z nowej gliny". Dlatego też obecna książka jest pisana na nowo. Zachowaliśmy ten sam styl i grafikę oraz to samo przedkładanie akcentowania głównych koncepcji nad fakty. Jednakże cel i poziom jest bardzo różny. Tu koncentrujemy się

---

*Mowa o *Molecular Biology of the Cell* autorstwa B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts i J.D. Watson, wydanej przez Garland Publishing, Inc. 1983, 1989, 1994

na tych właściwościach, które są wspólne dla większości komórek eukariotycznych i niezbędne do zrozumienia tego, jak poszczególna komórka żyje i mnoży się. Temu głównemu tematowi podporządkowano zagadnienia budowy i działania narządów oraz układów organizmów wielokomórkowych, procesu rozwoju i tysięcy dręczących ludzkość schorzeń, które coraz lepiej można zrozumieć w kanonach biologii komórki.

W książce położono akcent na przejrzystość. Tekst jest tak krótki, jak to było możliwe, a słownictwo specjalistyczne zredukowaliśmy do minimum. Dla dobra przedstawienia głównych koncepcji bez rozpraszania uwagi opuściliśmy nazwiska naukowców związanych z tymi koncepcjami, a także dygresje osobiste stanowiące tło każdej naukowej konkluzji. Przedstawione schematy wykonano z myślą o podkreśleniu koncepcji i pozbawiono zbędnych szczegółów. W każdym rozdziale hasła wprowadzone po raz pierwszy wyróżniono tłustym drukiem lub kursywą oraz zebrano na końcu książki w postaci obszernego ilustrowanego słowniczka. Nie podaliśmy spisu uzupełniającej literatury, uważamy bowiem, że w tego typu podręczniku wybór należy zostawić poszczególnym wykładowcom. Czytelników, którzy chcieliby zgłębić poszczególne zagadnienia, zachęcamy do skorzystania z obszernej listy publikacji podanej w *Biologii molekularnej komórki*.

Istotną częścią książki są liczne pytania przedstawione zarówno na marginesach tekstu, jak i na końcu każdego rozdziału. Mają one sprowokować studenta do analizowania tego, co właśnie przeczytał i zachęcić go do chwili przerwy w celu sprawdzenia stopnia przyswojenia wiadomości. Wiele pytań daje czytelnikowi szansę umieszczenia nowo zdobytej informacji w szerszym kontekście biologicznym i na niektóre z nich istnieje więcej niż jedna poprawna odpowiedź. Inne pytania zachęcają do rozważań myślowych. Na końcu książki podano odpowiedzi na wszystkie pytania; w wielu przypadkach odpowiedzi te mają charakter komentarza tekstu głównego lub innej interpretacji zawartego w nim materiału. Podobnie jak w *Biologii molekularnej komórki* wszystkie rozdziały tej książki powstały wspólnym wysiłkiem przez poddawanie każdego rękopisu ocenie wszystkich autorów. Poza tym pomagało nam wiele osób. W specyficznych tematach korzystaliśmy z uwag kilku naukowców, w tym: Raoula Andino, Elizabeth Blackburn, Christine Guthrie, Tima Hunta, Joachima Li oraz Normana Pace. Otrzymaliśmy obszerne komentarze od nauczycieli akademickich i studentów, które zostały zebrane i scalone przez Valerie Neal. Nauczycielami tymi byli: Jerry Brand, University of Texas at Austin; Heinz Gert de Couet, University of Hawaii; Michael A. Goldman, San Francisco State University; W. Michael Gray, Bob Jones University; Michael Lewitt, Anglia University; Herbert Lin, National Research Council; Linda Matsuuchi, University of British Columbia; Sheldon S. Shen, Iowa State University i Jim Shinkle, Trinity University. Wypowiadający się studenci pochodzili z Bob Jones University i z San Francisco State University. Opracowanie redakcyjne każdego rozdziału, często wielokrotne, prowadziła Eleanor Lawrence, dbając o poprawność językową i stylistyczną. Wszystkim tym osobom jesteśmy niezmiernie wdzięczni za ich nieocenioną pomoc.

Grono redakcyjne z Garland Publishing było zawsze pomocne i stymulujące. Ruth Adams znacznie wcześniej niż inni dostrzegła potencjalną wartość tego typu książki. Ilustracje stworzone przez Keitha Robertsa zostały wykonane komputerowo z dużą zręcznością i talentem przez Nigela Orme. Okładkę zaprojektował John M-Roblin, książkę opracował do druku Douglas Goertzen, a wydrukował Perry Bessas. Donna Scholes przewodziła pełnemu entuzjazmu zespołowi, który badał rynek oraz zebrał opinie i sugestie wielu wykładowców. Nowym, ale pełnym życia do-

datkiem do zespołu wydawnictwa Garland była Anne Vinnicombe, która jako szef produkcji pilnowała naszych napiętych terminów.

Większa część książki została napisana w St. John's Wood, Londyn, gdzie pomagał nam zespół londyńskiego biura firmy Garland. Emma Hunt, Nasreen Arain, Sheila Archibald i Matthew Day — to osoby, którym jesteśmy wdzięczni za ich niestrudzoną pomoc. Miranda Robertson prowadziła ten zespół i doglądała każdego szczegółu procesu powstawania książki, począwszy od redagowania tekstu do kierowania sekretariatem i dbania o materiały, a nawet o posiłki. Jak w przeszłości, styl naszej książki został wzbogacony przez Emily Preece Foden. Może pewnego dnia weźmie swój rok urlopu naukowego i napisze *Poradnik pisania Biologii molekularnej komórki*. Ale jeszcze nie teraz Emily, jeszcze nie. Jesteśmy też wdzięczni Libby Borden, Pani Prezes Garland Publishing. Od czasu, kiedy sześć lat temu przedwczesna śmierć Gavina Bordena postawiła ją na czele wydawnictwa, Libby prowadzi je w wielkim stylu. Jej zachęty i pomoc nigdy nie osłabły; bez Niej nie byłoby tej książki.

Mimo naszych największych wysiłków na pewno znajdą się w książce błędy. Zachęcamy czytelników, aby jeżeli je odkryją, zawiadomili nas o tym, dzięki czemu będziemy mogli je poprawić we wznowieniu (e-mail: ecb@garland. com; fax 212-308-9399).

Przedmowa do wydania polskiego

Nadchodzący XXI wiek niewątpliwie zyska sobie miano wieku biologii. Wynika to z niezwykle szybkiego i wciąż rosnącego tempa rozwoju tej dziedziny wiedzy, już obecnie mającej wielki wpływ na medycynę, rolnictwo, zrozumienie konieczności ochrony środowiska naturalnego i rozwój wielu nowych technologii. Nauki biologiczne, szczególnie molekularna biologia komórki, wywierają też coraz wyraźniejszy wpływ na inne dziedziny, takie jak informatyka, filozofia, prawo i rozmaite dyscypliny humanistyczne. Wszystko to sprawia, że wiedza o molekularnych podstawach rozwoju organizmów staje się niezbędna nie tylko dla osób bezpośrednio związanych z biologią, lecz także dla tych wszystkich, którzy starają się sprostać wymogom współczesności.

Uwzględniając te światowe trendy uznaliśmy za nasz obowiązek udostępnienie polskiemu Czytelnikowi książki *Podstawy biologii komórki*, stanowiącej doskonały podręcznik wprowadzający w fascynujący świat molekularnych mechanizmów funkcjonowania komórek i organizmów. Podręcznik ten jest przeznaczony w zasadzie dla studentów biologii, biotechnologii, medycyny i rolnictwa. Wierzymy jednak, że chętnymi jego czytelnikami będą również studenci innych kierunków, a także specjaliści tych różnych dziedzin, na które biologia wywiera coraz większy wpływ.

Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej od nowa opracował prawie ten sam zespół Autorów, który napisał obszerniejszy, znany na całym świecie podręcznik *Molecular Biology of the Cell*. Edycja z 1998 roku, której przekład stanowi niniejsza książka, zyskała opinię jednego z najlepszych podręczników akademickich, przystępnego i aktualnego. By nie stracić tej ostatniej jego zalety, przekładu dokonano szybko, co wymagało pracy dość licznego zespołu tłumaczy. Mogło to spowodować pewne niejednolitości stylu lub stosowanych sformułowań, czego, być może, nie udało się całkowicie wyeliminować. Za ewentualne pomyłki stąd wynikające przepraszamy Czytelników i prosimy o odpowiednie uwagi.

Znakomity udział w przygotowaniu polskiej wersji tego podręcznika miał profesor Jan Michejda, wybitny specjalista w zakresie biologii komórki i bioenergetyki, świetny wykładowca i nauczyciel. Będąc redaktorem naukowym i współtłumaczem, w ostatnich dniach życia zdołał dokonać korekty przekładu tej książki, niestety nie doczekał jej ukazania się na półkach księgarskich. Dlatego prosimy Czytelników, by *Podstawy biologii komórki* chcieli przyjąć jako kontynuację Jego działalności.

Tłumacze i Redakcja PWN

Spis rozdziałów

Rozdział 3 Energia, kataliza i biosynteza

Rozdział 4 W jaki sposób komórki uzyskują energię z pokarmu

Rozdział 5 Struktura i funkcje białek

Rozdział 6 DNA

Rozdział 7 Od DNA do białka

Rozdział 13 Przekształcanie energii w mitochondriach i chloroplastach

Rozdział 14 Przedziały wewnątrzkomórkowe i transport

Rozdział 15 Sygnalizacja międzykomórkowa

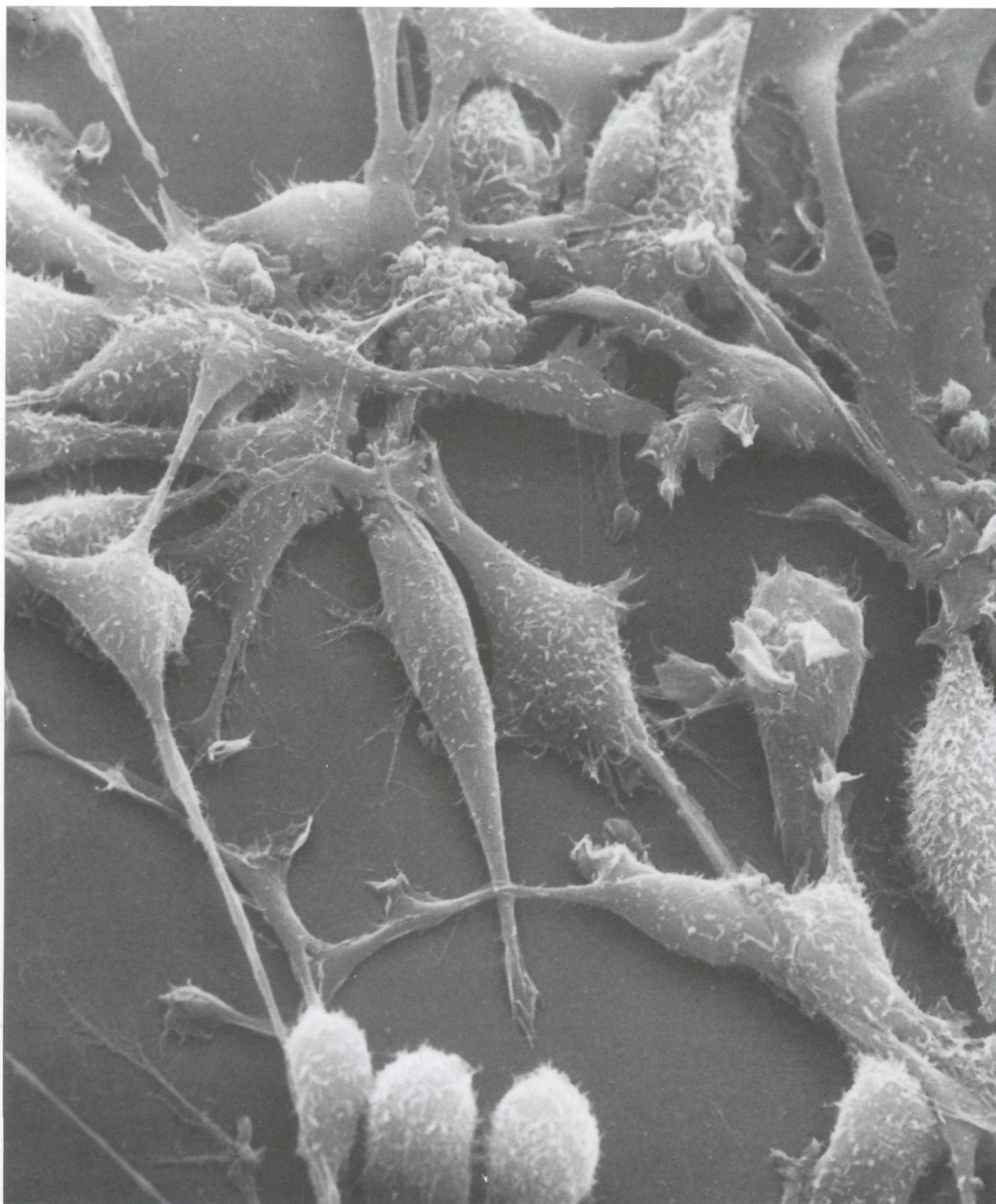
Rozdział 16 Cytoszkielet

Rozdział 17 Podział komórki

Rozdział 18 Kontrola cyklu komórkowego i śmierć komórki

Rozdział 19 Tkanki

Podstawy biologii komórki



Komórki pobrane z organizmu wielokomórkowego mogą przeżywać i proliferowć (mnożyć się i różnicować), dopóki są zaopatrywane w odpowiednią mieszankę składników odżywczych i czynników wzrostu. Skaningowa mikrografia elektronowa pokazuje grupę komórek szczura rosnących na plastikowej powierzchni naczynia hodowlanego. Okrągłe komórki na dole zdjęcia są w trakcie podziału. Taka zdolność do wzrostu komórek w hodowli umożliwia ich badanie metodami, których nie można by zastosować do całej tkanki (Dzięki uprzejmości: Guenter Albrecht-Buehler)

1

Komórki — wprowadzenie

KOMÓRKI POD MIKROSKOPEM

- Wynalezienie mikroskopu świetlnego doprowadziło do odkrycia komórek
- Pod mikroskopem można oglądać komórki, organelle, a nawet cząsteczki

KOMÓRKA EUKARIOTYCZNA

- Jądro jest magazynem informacji w komórce
- Mitochondria uwalniają z pokarmów energię potrzebną do zasilania komórki
- Chloroplasty wychwytują energię światła słonecznego
- Błony tworzą wewnątrzkomórkowe przedziały pełniące odmienne funkcje
- Cytozol jest zagęszczonym żelem wodnym wielkich i małych cząsteczek
- Cytoszkielet jest odpowiedzialny za ruchy komórki

JEDNOŚĆ I RÓŻNORODNOŚĆ KOMÓREK

- Komórki różnią się niezmiernie wyglądem i funkcją
- Funkcje wszystkich żywych komórek opierają się na podobnych podstawowych procesach chemicznych
- Wszystkie żyjące dziś komórki najwidoczniej powstały przez ewolucję tej samej prakomórki
- Bakterie są najmniejszymi i najprostszymi komórkami
- Biologowie molekularni skoncentrowali swą uwagę na *E. coli*
- *Giardia* może stanowić pośredni etap w ewolucji komórek eukariotycznych
- Drożdże piekarskie są przykładem prostej komórki eukariotycznej
- Organizmy jednokomórkowe mogą być duże, złożone i agresywne: pierwotniaki
- *Arabidopsis* wybrano jako roślinę modelową spośród 300 000 gatunków
- Świat zwierzęcy reprezentują muszka, nicień, mysz i *Homo sapiens*
- W wielokomórkowym organizmie komórki mogą być spektakularnie różne

Wszystkie istoty żywe zbudowane są z komórek — małych, otoczonych błoną jednostek, wypełnionych stężonym wodnym roztworem związków chemicznych i wyposażonych w niezwykłą zdolność tworzenia swych własnych kopii w drodze wzrostu i podziału na dwie jednostki potomne. Najprostszą formą życia są pojedyncze komórki. Organizmy wyższe, takie jak my sami, są zespołami komórek wywodzących się przez wzrost i podział z pojedynczej komórki wyjściowej. Można je porównać do dużego miasta, którego poszczególni mieszkańcy pełnią wyspecjalizowane funkcje, a ich działania są skoordynowane zawiłymi systemami komunikowania się.

Wprawdzie komórki mogą być składnikami większych żywych organizmów, nie można jednak mówić o prawdziwym życiu poniżej poziomu jednej komórki. Na przykład wirusy zawierają pewne typy cząsteczek występujących w komórkach, ale nie potrafią się same rozmnażać; mogą się kopiować tylko przez pasożytnicze wykorzystanie aparatu reprodukcyjnego zaatakowanej komórki. Dlatego też fundamentalnymi jednostkami życia są komórki i właśnie tylko biologia komórki może udzielić odpowiedzi na pytania, czym jest życie i jak ono działa.

W tym rozdziale najpierw zastanowimy się, jak można oglądać komórki i co zobaczymy, gdy zajrzymy do ich wnętrza. Następnie przyjrzymy się wielkiej różnorodności form komórek oraz zapoznamy się pobieżnie z maszynerią chemiczną wspólną dla wszystkich komórek.

Komórki pod mikroskopem

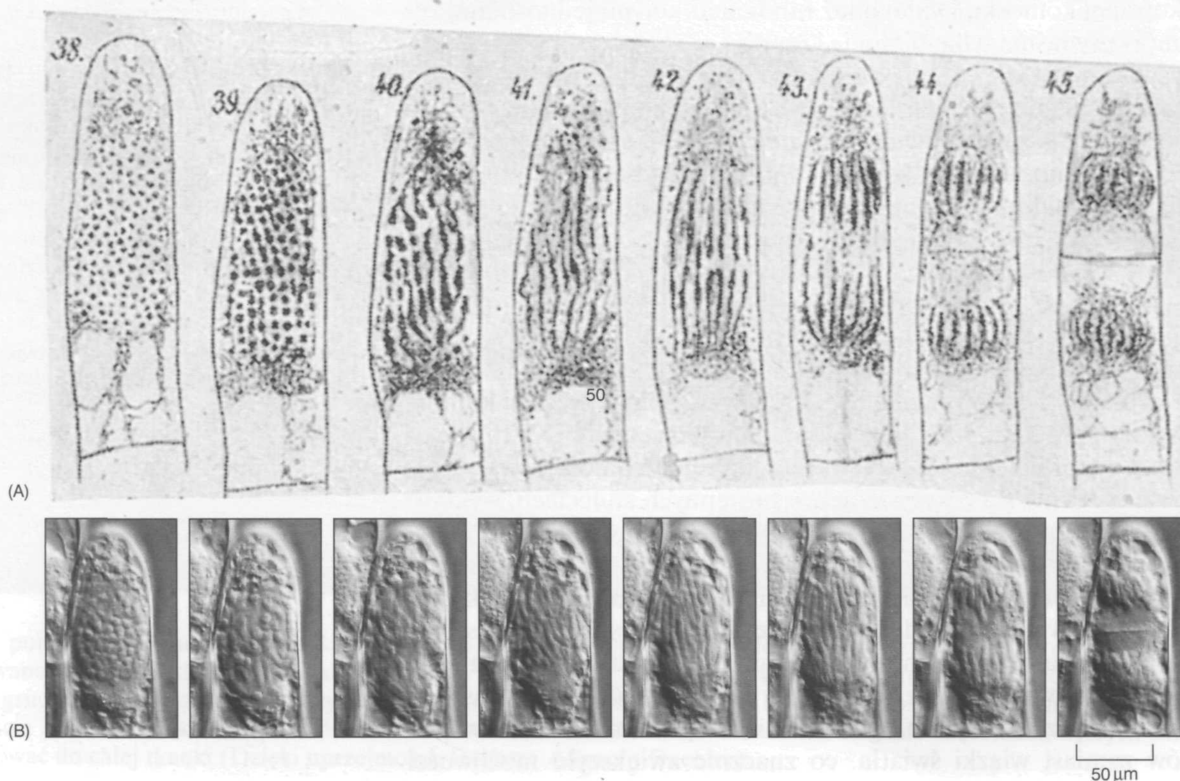
Komórki są małe i pierwszym praktycznym problemem w biologii komórki jest, w jaki sposób można je oglądać. Wynalezienie w XVII wieku **mikroskopu** umożliwiło po raz pierwszy zobaczenie komórek i wszystko, czego dowiedzieliśmy się o komórkach w następnych stuleciach, wykryto za pomocą tego prostego przyrządu. *Mikroskop świetlny* jest nadal głównym elementem wyposażenia dla biologów komórki. Chociaż znacznie ulepszono go i wyposażono w nowe skomplikowane funkcje, jednak właściwości samego światła nakładają ograniczenie co do subtelności szczegółów, które można dostrzec za pomocą tego przyrządu. *Mikroskop elektronowy,* skonstruowany po raz pierwszy w latach trzydziestych naszego wieku, pozwolił przekroczyć to ograniczenie dzięki zastosowaniu wiązki elektronów zamiast wiązki światła, co znacznie zwiększyło możliwości

rozróżnienia w komórce najdrobniejszych szczegółów, a nawet zobaczenia pewnych wielkich cząsteczek. Przegląd głównych typów mikroskopów używanych do badań komórki podano w panelu 1-1 (s. 4-5).

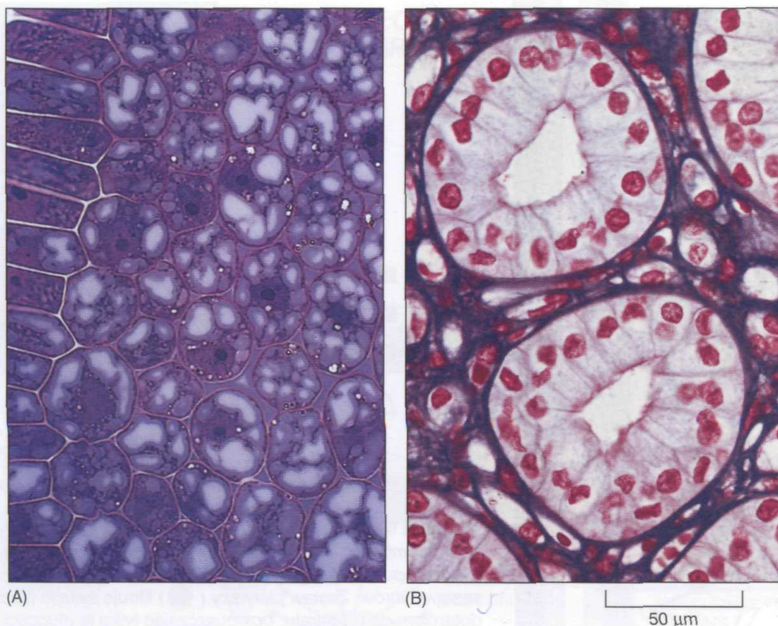
Wynalezienie mikroskopu świetlnego doprowadziło do odkrycia komórek

Rozwój mikroskopu świetlnego zależał od postępu w wytwarzaniu szklanych soczewek. W XVII wieku soczewki były już tak dobre, że można ich było użyć do zbudowania prostych mikroskopów. W roku 1665 Robert Hooke zakomunikował na zebraniu Towarzystwa Królewskiego w Londynie, że badając kawałek korka stwierdził, iż jest on zbudowany z ogromnej ilości maleńkich przedziałów, które nazwał komórkami. Nazwa „komórka" przyjęła się, mimo że struktury oglądane przez Hooka były tylko ścianami komórkowymi pozostawionymi przez żyjące uprzednio w ich obrębie komórki. Nieco później Hook i jego współcześni mogli już oglądać żywe komórki.

Przez prawie dwieście lat mikroskop świetlny pozostawał instrumentem niezwykłym, dostępnym tylko dla nielicznych bogatych ludzi. Dopiero w XIX wieku zaczęto powszechnie używać mikroskopu do oglądania żywych komórek. Wyłonienie się biologii komórki jako odrębnej dziedziny wiedzy było procesem stopniowym i wynikiem współpracy wielu osób. Za oficjalny początek tej dyscypliny naukowej uważa się dwie publikacje: botanika Matthiasa Schleidena w 1838 r. i zoologa Theodora Schwanna w 1839 r. W pracach tych autorzy przedstawili uzyskane za pomocą mikroskopu świetlnego wyniki systematycznych badań tkanek roślinnych i zwierzęcych wykazujące, że komórki są uniwersalnymi jednostkami budującymi wszystkie żywe tkanki. Prace tych autorów i innych badaczy posługujących się w XIX wieku mikroskopem — przykład wyników ilustruje rys. 1-1 — pozwoliły stopniowo zrozumieć, że wszystkie żywe komórki



Rys. 1-1. **Historyczne obrazy komórek.** (A) Rysunki żywej komórki roślinnej (komórka włoska z kwiatu *Tradescantia*), obserwowanej w czasie 2,5-godzinnego podziału na dwie komórki potomne, przez Edwarda Strasburgera w 1880 r. (B) Porównywalna żywa komórka sfotografowana współcześnie w nowoczesnym mikroskopie świetlnym. (B dzięki uprzejmości: Peter Hepler)



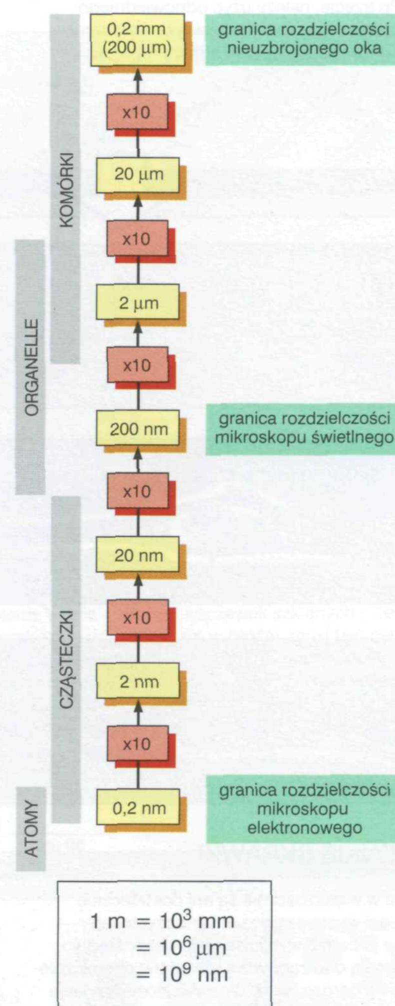
Rys. 1-2. Komórki w tkankach roślinnych i zwierzęcych. (A) Komórki wierzchołka korzenia rośliny, z których każda otoczona jest matriks zewnątrzkomórkową (ścianą komórkową) wybarwioną na *czerwono.* (B) Komórki zbiorczego kanalika moczowego nerki. Każdy kanalik jest utworzony z gęsto upakowanych, pierścieniowo ułożonych komórek, w których jądra wybarwiono na *czerwono.* Pierścień komórek otacza matriks zewnątrzkomórkowa, wybarwiona na *fioletowo.* (B z: P. R. Wheather et al., *Functional Histology,* 2nd ed., 1987, Churchill Livingstone)

powstają przez podział komórek już istniejących; to twierdzenie określa się czasem jako *teorię komórkową*. Wynikający z niego wniosek, że żywe organizmy nie powstają spontanicznie, ale wywodzą się z już istniejących organizmów, ostro kwestionowano, dopóki nie potwierdziły go w końcu wyniki doświadczeń przeprowadzonych w latach sześćdziesiątych XIX w. przez Louisa Pasteura.

Zasada, że komórki powstają tylko z komórek już egzystujących uprzednio i że dziedziczą po nich swoje cechy, leży u podstaw całej biologii i powoduje, że w tej dziedzinie wiedzy wszelkie pytania o chwilę obecną są nieodłącznie związane z pytaniami o przeszłość. Aby zrozumieć, dlaczego dzisiejsze komórki i organizmy zachowują się tak a nie inaczej, musimy zrozumieć ich historię, cofając się poprzez pokolenia do mglistych początków pojawienia się pierwszych komórek na ziemi. Kluczem do zrozumienia historii rozwoju organizmów stała się opublikowana w 1859 r. teoria ewolucji Darwina, wykazująca jak przypadkowa zmienność i dobór naturalny mogą prowadzić do powstania organizmów o nowych cechach. Jak omówimy to później w tym rozdziale, teoria ewolucji wyjaśnia, w jaki sposób pojawiła się różnorodność wśród organizmów mających wspólnego przodka. Teoria ewolucji w połączeniu z teorią komórkową pozwala nam patrzeć na całość zjawiska życia, od jego początku aż do chwili obecnej, jako na rozległe drzewo genealogiczne indywidualnych komórek. Z aspektem ewolucyjnym spotykać się będziemy często, aczkolwiek celem tej książki jest przede wszystkim wyjaśnienie, jak komórki działają obecnie.

Pod mikroskopem można oglądać komórki, organelle, a nawet cząsteczki

Jeśli zetnie się bardzo cienki skrawek odpowiedniej tkanki zwierzęcej lub roślinnej i umieści się go pod mikroskopem świetlnym, można zobaczyć, że tkanka podzielona jest na tysiące małych komórek, które albo ściśle do siebie przylegają, albo są oddzielone materią zwaną *substancją międzykomórkową* (*matriks zewnątrzkomórkową*) (rys. 1-2). Przeciętna średnica komórki wynosi około 5–20 **mikrometrów**, czyli μm (rys. 1-3). Jeśli

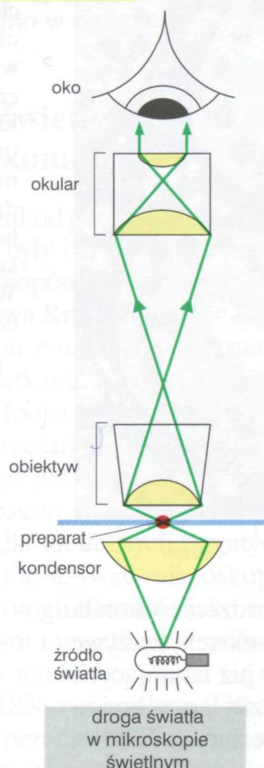


Rys. 1-3. Rozmiary komórek i ich części składowych oraz jednostki, w których się je mierzy

MIKROSKOP ŚWIETLNY

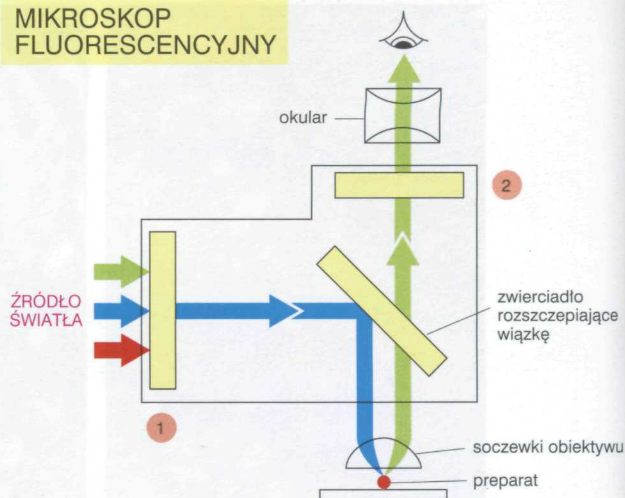


Mikroskop świetlny pozwala na powiększenie komórek do tysiąca razy i rozróżnienie szczegółów o wymiarze 0,2 μm (ograniczenie to wynika z falowej natury światła, a nie z jakości soczewek). Do oglądania komórek w mikroskopie świetlnym potrzeba trzech czynników. Po pierwsze, światło musi zostać skupione na badanym preparacie za pomocą soczewek kondensora. Po drugie, preparat musi być odpowiednio przygotowany, tak aby światło mogło przezeń przechodzić. Po trzecie, należy użyć odpowiedniego zestawu soczewek (obiektywu i okularu) ogniskującego w oku obraz preparatu

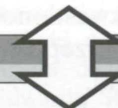


droga światła w mikroskopie świetlnym

MIKROSKOP FLUORESCENCYJNY

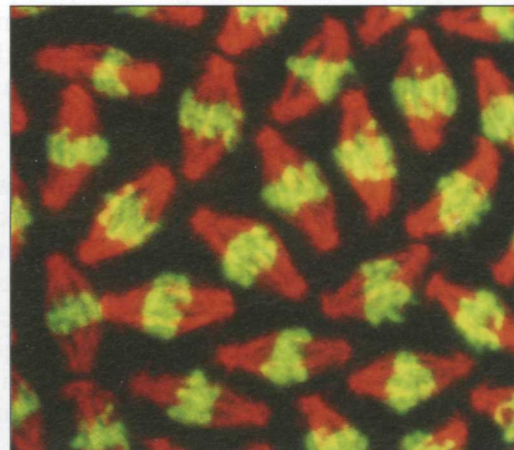


Znaczniki fluorescencyjne użyte do barwienia komórek wykrywa się za pomocą *mikroskopu fluorescencyjnego*. Jest on podobny do zwykłego mikroskopu świetlnego poza tym, że światło przechodzi przez dwa zestawy filtrów. Zestaw pierwszy (1) filtruje światło przed jego dotarciem do preparatu, przepuszczając tylko te długości fali, które pobudzają odpowiedni znacznik fluorescencyjny. Zestaw drugi (2) zatrzymuje to światło, a z kolei przepuszcza tylko te długości fal, które są emitowane przez znacznik fluorescencyjny. Znakowane obiekty ukazują się w jasnym kolorze na ciemnym tle



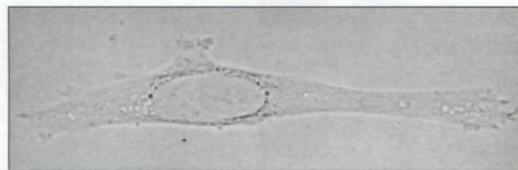
ZNACZNIKI FLUORESCENCYJNE

Dzielące się komórki widziane w mikroskopie fluorescencyjnym po wybarwieniu specyficznymi znacznikami fluorescencyjnymi.

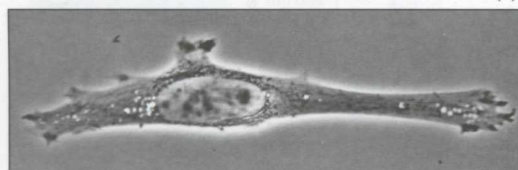


Barwniki fluorescencyjne absorbują światło o pewnej długości fali, a emitują światło o innej, dłuższej fali. Niektóre z nich wiążą się specyficznie z poszczególnymi cząsteczkami w komórkach, co pozwala badać ich umiejscowienie za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Przykładem jest pokazane tu specyficzne wyznakowanie DNA (kolor *zielony*). Inne znaczniki mogą być sprzężone z cząsteczkami przeciwciał i tworzą wtedy bardzo swoiste i wszechstronne barwniki, które wiążą się wybiórczo z poszczególnymi rodzajami makrocząsteczek i dają obraz ich rozmieszczenia w komórce. W pokazanym przykładzie białka mikrotubul wrzeciona mitotycznego wybarwiono na kolor *czerwony* przeciwciałem fluorescencyjnym. (Dzięki uprzejmości: William Sullivan)

TRZY TYPY MIKROSKOPU ŚWIETLNEGO



(A)



(B)



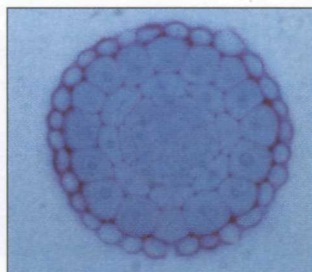
(C)

50 μm

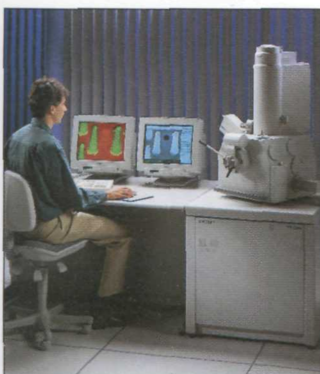
Trzy obrazy tej samej niebarwionej komórki zwierzęcej z kultury *in vitro*. (A) obraz oglądany w świetle przechodzącym (jasne tło). Więcej szczegółów można zobaczyć używając bardziej złożonych układów optycznych, takich jak *optyka kontrastu fazowego* (B) i *optyka* kontrastu *różnicowo--interferencyjnego* (C). Układy te wykorzystują różnice przechodzenia światła przez obszary komórki o różnym współczynniku załamania. Wszystkie te trzy obrazy można łatwo uzyskać posługując się tym samym mikroskopem, a zmieniając jedynie składniki optyczne

CIENKIE SKRAWKI

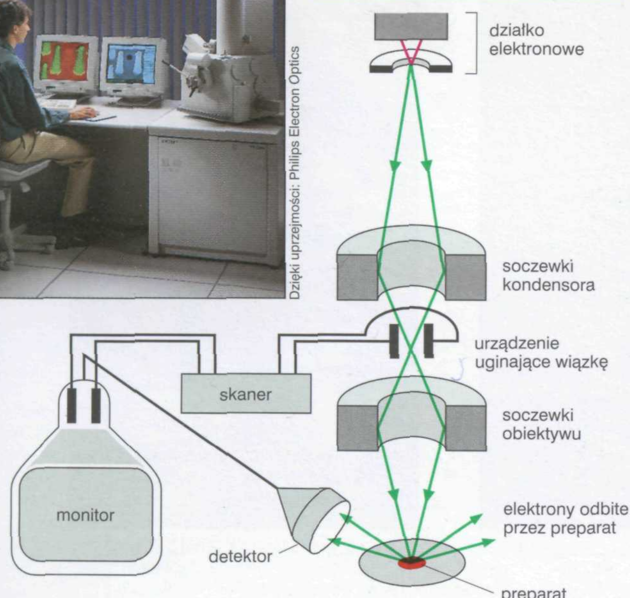
Tkanki w większości nie są ani dostatecznie małe, ani wystarczająco przezroczyste, aby można je badać w mikroskopie bezpośrednio. Dlatego są one zazwyczaj utrwalane chemicznie i cięte na bardzo cienki skrawki, które przykleja się do szkiełka mikroskopowego i następnie wybarwia w celu odróżnienia poszczególnych składników komórek. Tu pokazano wybarwiony skrawek wierzchołka korzenia



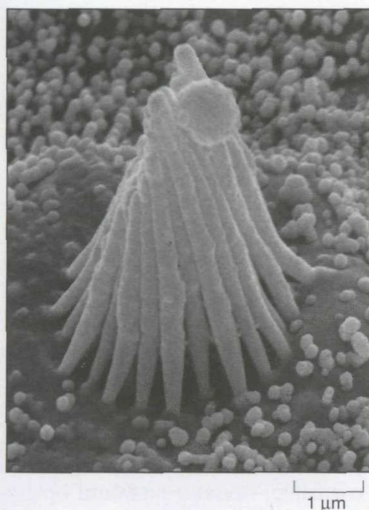
SKANINGOWY MIKROSKOP ELEKTRONOWY

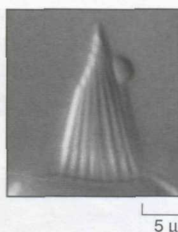


Dzięki uprzejmości: Philips Electron Optics



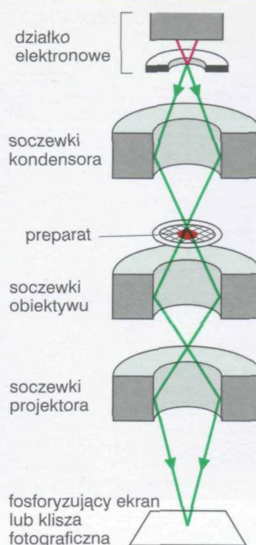
W skaningowym mikroskopie elektronowym (SME) preparat, który pokryto bardzo cienką warstwą metalu ciężkiego, jest skanowany wiązką elektronów zogniskowaną na preparacie przez cewki elektromagnetyczne, które w mikroskopach elektronowych działają jako soczewki. W miarę bombardowania przez wiązkę każdego kolejnego punktu na powierzchni preparatu detektor mierzy liczbę elektronów ugiętych (rozproszonych) lub odbitych, którą traktuje się jako kontrolę intensywności kolejnych punktów na obrazie powstającym na ekranie kontrolnym. Mikroskop tworzy wyraziste obrazy trójwymiarowych przedmiotów – o dużej głębi ostrości i rozdzielczości od 3 nm do 20 nm, zależnie od typu aparatu

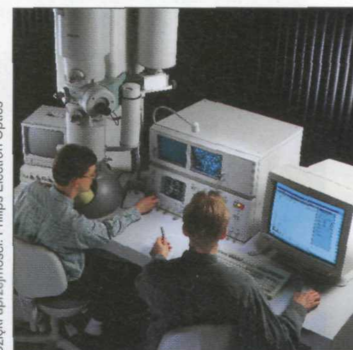




Skaningowa mikrografia elektronowa stereociliów wystających z rzęsatej komórki zmysłowej w uchu wewnętrznym (*po lewej*). Dla porównania, obraz tej samej struktury widziany w mikroskopie świetlnym na granicy jego rozdzielczości (*u góry*). (Dzięki uprzejmości: Richard Jacobs i James Hudsepth)

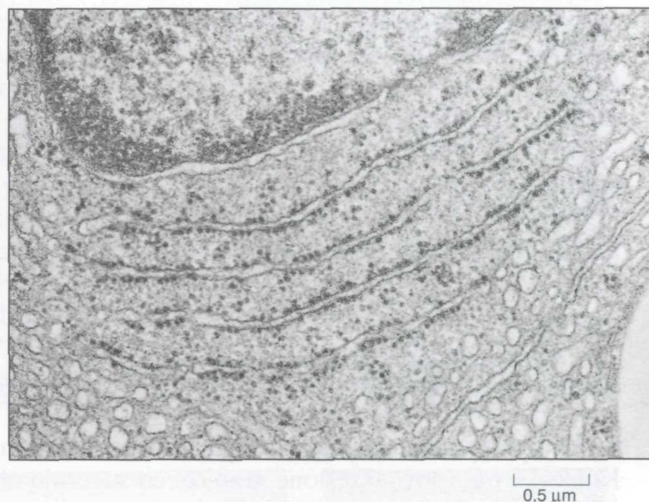
TRANSMISYJNY MIKROSKOP ELEKTRONOWY





Dzięki uprzejmości: Philips Electron Optics

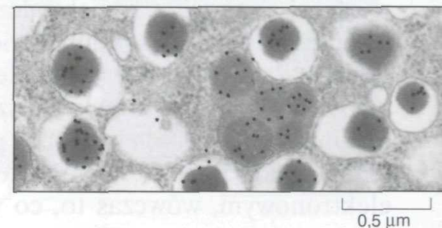
Mikrografia elektronowa (*poniżej*) pokazuje mały obszar komórki w skrawku jądra. Tkankę utrwalono chemicznie, zatopiono w plastiku (żywicy) i pocięto na ultracienkie skrawki, które przed umieszczeniem w próżni mikroskopu skontrastowano solami uranu i ołowiu. (Dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)

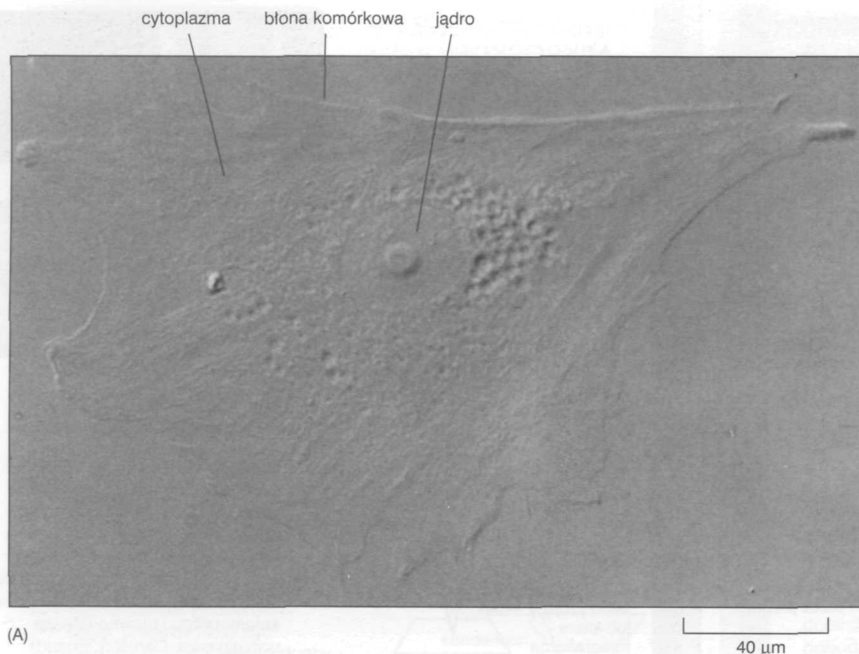


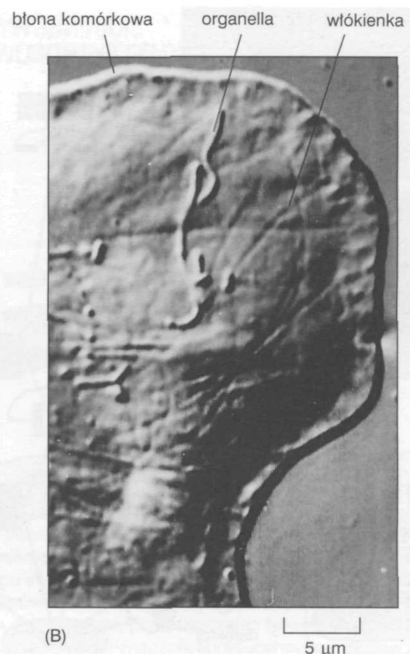
Transmisyjny mikroskop elektronowy (TME) jest w zasadzie podobny do odwróconego mikroskopu świetlnego, ale zamiast wiązki światła używa wiązki elektronów, a do skupienia wiązki – zamiast soczewek szklanych – cewek magnetycznych. Preparat, który umieszcza się w próżni, musi być niezwykle cienki. Kontrast uzyskuje się zazwyczaj przez nałożenie barwników zawierających elektronowo gęsty metal ciężki, który lokalnie albo pochłania, albo rozprasza elektrony, usuwając je z wiązki w czasie jej przechodzenia przez preparat. TME umożliwia użytkowe powiększenie aż do miliona razy i – dla preparatów biologicznych – rozdzielczość około 2 nm

SONDY ZNAKOWANE ZŁOTEM

W ten sam sposób, w jaki barwniki fluorescencyjne związane z sondami molekularnymi pozwalają na wykrycie specyficznych cząsteczek w mikroskopie świetlnym, malutkie cząstki złota można sprzęgać z sondami molekularnymi w celu wykrycia umiejscowienia specyficznych cząsteczek za pomocą mikroskopu elektronowego. W typowym przypadku przeciwciała o znanej swoistości łączy się z elektronowo gęstymi kuleczkami koloidowego złota (5–20 nm średnicy) i stosuje się do znakowania cienkich skrawków komórek lub tkanek; proces ten określa się jako mikroskopię elektronową z użyciem immunozłota. Kuleczki złota wyglądają w mikroskopie elektronowym jak maleńkie czarne kropki. Pokazany przykład przedstawia cienki skrawek komórki trzustki wydzielającej insulinę, w którym przeciwciało przeciwinsulinowe znakowane złotem ujawniło wewnątrzkomórkowe umiejscowienie insuliny. (Z: L. Orci, *Diabetologia* 28:528-546, 1985)







zachowano ostrożność, utrzymując próbkę we właściwych warunkach, można zobaczyć w komórkach znaki życia: ruch cząstek w obrębie komórki i jeśli ma się dużą cierpliwość, powolne zmiany kształtu oraz podział na dwie komórki (patrz rys. 1-1).

Znacznie trudniej ujrzeć wewnętrzną strukturę komórki, nie tylko dlatego, że jej części są bardzo małe, ale też dlatego, że są one przeźroczyste i z zasady bezbarwne. Można posłużyć się wybarwianiem komórek, które nadaje różnym składnikom odmienne kolory (patrz rys. 1-2). Można też wykorzystać fakt, że poszczególne składniki komórki mają różny współczynnik załamania światła (tak jak szkło różni się od wody) i że te drobne różnice można uwidocznić stosując odpowiednie urządzenia optyczne (patrz panel 1-1). Obecnie obraz mikroskopowy można jeszcze wzmocnić przetwarzając go elektronicznie.

Użycie tych metod pozwala wgłębić się w anatomię komórki (rys. 1-4). Komórka ma ostro określone granice, co sugeruje obecność otaczającej ją *błony*. W środku wyraźnie widać wielkie, okrągłe ciało, *jądro*. Otacza je przeźroczysta substancja wypełniająca resztę wnętrza komórki — **cytoplazma**, w której widać pozornie chaotycznie rozmieszczone różne drobne obiekty. Za pomocą dobrego mikroskopu świetlnego można zacząć wyróżniać specyficzne składniki cytoplazmy (rys. 1-4B) i próbować je sklasyfikować, ale nie można rozróżnić szczegółów mniejszych niż ok. 0,2 μm, tj. połowy długości fali światła widzialnego.

W celu uzyskania większych powiększeń należy użyć mikroskopu elektronowego, który może rozróżnić szczegóły rzędu kilku **nanometrów**, czyli nm (patrz rys. 1-3). Wymaga to jednak specjalnego przygotowania oglądanego obiektu. Nawet do mikroskopii świetlnej badane tkanki trzeba zazwyczaj przed oglądaniem *utrwalić* (tj. zakonserwować w roztworze odpowiednich odczynników), unieruchomić przez *zatopienie* w zestalonym wosku lub żywicy, *pociąć* na cienkie skrawki i *wybarwić*. Podobna procedura jest też niezbędna dla mikroskopii elektronowej, ale w tej technice skrawki muszą być znacznie cieńsze i nie ma wtedy możliwości oglądania komórek przyżyciowo, w stanie wilgotnym. Skoro jednak takie pocięte i wybarwione skrawki umieści się w mikroskopie elektronowym, wówczas to, co wydawało się zaśmiecającą cytoplazmę

Rys. 1-4. **Żywa komórka oglądana w mikroskopie świetlnym, z widocznym jądrem i cytoplazmą.** (A) Komórka pobrana ze skóry człowieka, rosnąca w hodowli tkankowej, sfotografowana w mikroskopie świetlnym. W cytoplazmie można wyróżnić włókienka i organelle. (B) Wycinek komórki traszki, rosnącej w hodowli. Na powiększonym komputerowo obrazie z ekranu, uzyskanym przy silnym powiększeniu, można zauważyć liczne organelle i włókienka. (Dzięki uprzejmości: A — Casey Cunningham; B — Lynne Cassimeris)

Rys. 1-5. (*strona obok*) **Ultrastruktura komórki widziana w transmisyjnym mikroskopie elektronowym.** (A) W cienkim skrawku widać ogromną ilość szczegółów. Pewne składniki o których będzie mowa w tym rozdziale, opisano nazwami opierając identyfikację na wielkości i kształcie. (B) Mały wycinek cytoplazmy komórki w większym powiększeniu. Najmniejsze wyraźnie widoczne struktury to rybosomy, z których każdy składa się z ok. 80–90 poszczególnych wielkich cząsteczek. (C) Preparat DNA wyizolowany z komórki; udowadnia to, że w mikroskopie elektronowym można zobaczyć pojedyncze wielkie cząsteczki. (Dzięki uprzejmości: A i B — Daniel S. Friend; C — Mei Lie Wong)

błona komórkowa

jądro

retikulum endoplazmatyczne

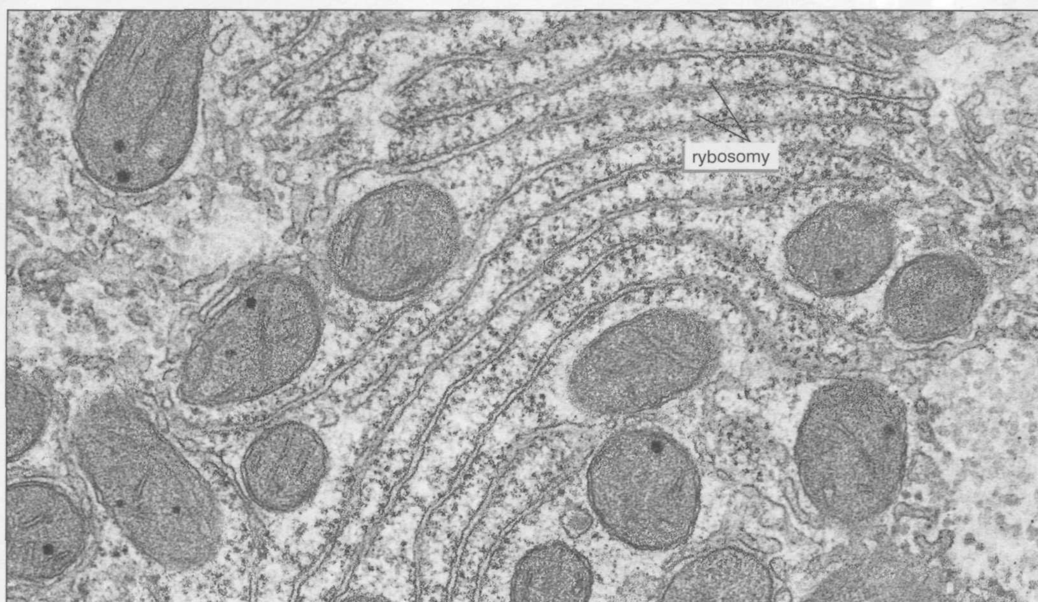
mitochondrium

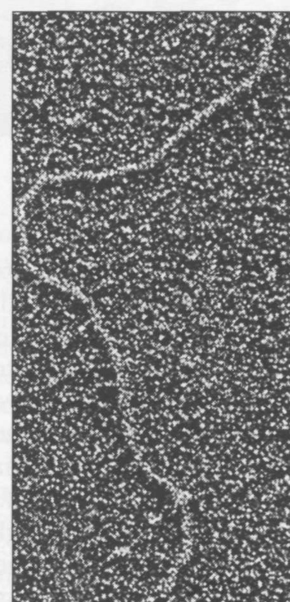
peroksysom

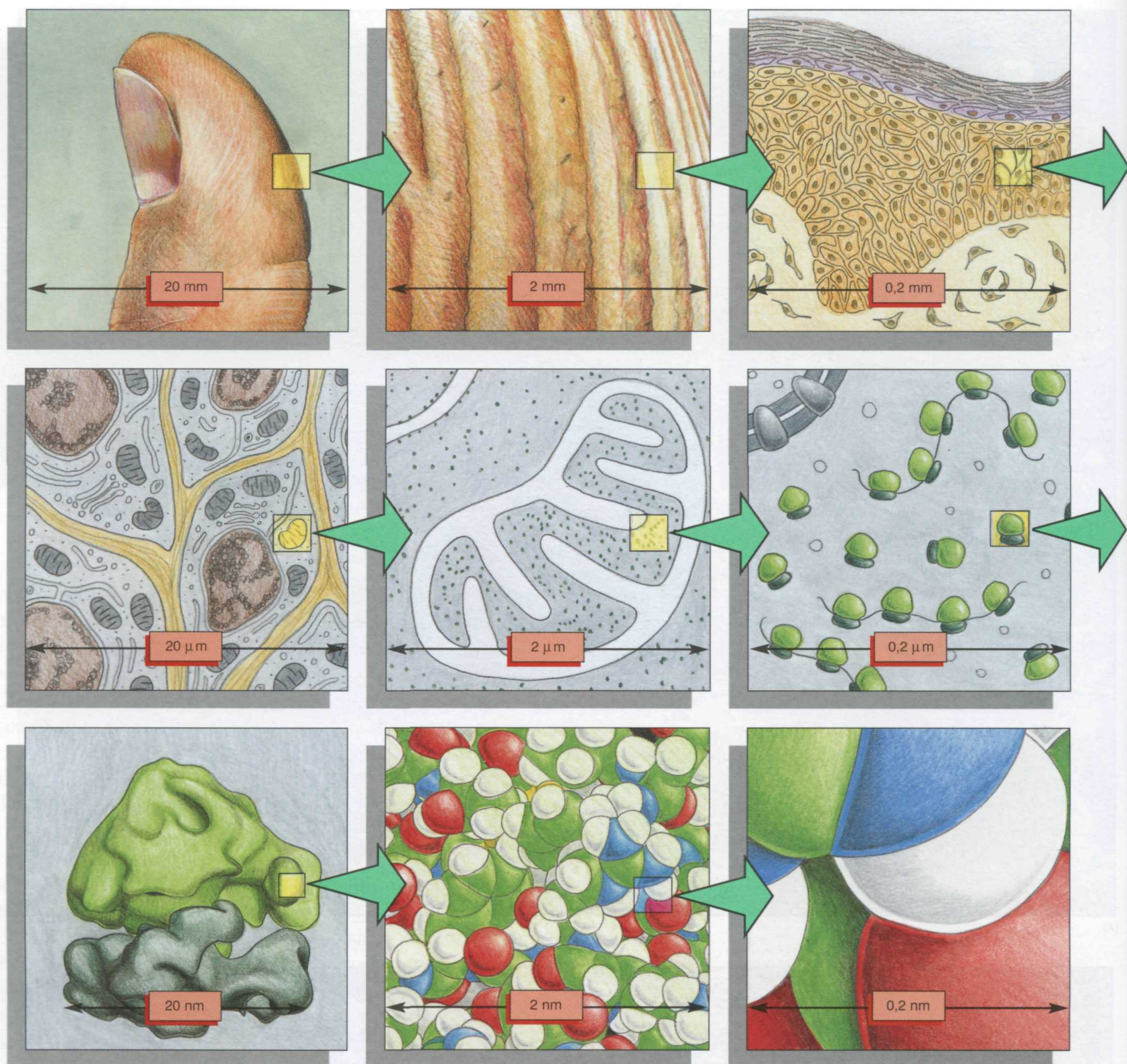
lizosom

(A)

2 µm





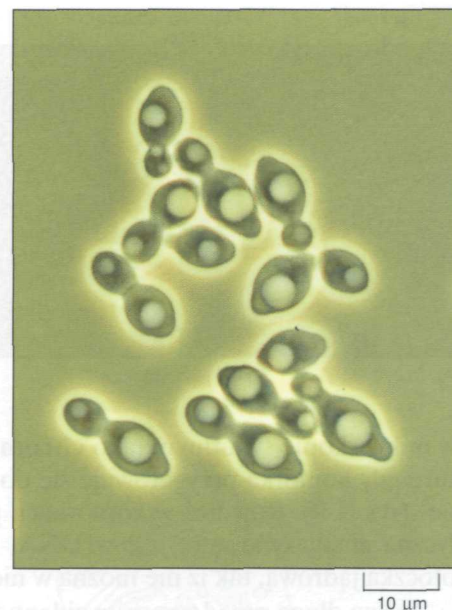


zbieraniną, można wyróżnić jako odrębne **organelle** i przyjrzeć się ich szczegółom. Widać wtedy delikatną błonę o grubości ok. 5 nm, otaczającą komórkę, i podobne błony otaczające poszczególne organelle (rys. 1-5A i B). Ta pierwsza to *błona komórkowa*, natomiast pozostałe obejmuje się nazwą *błony wewnątrzkomórkowe*. W mikroskopie elektronowym można nawet zobaczyć w komórce poszczególne wielkie cząsteczki (rys. 1-5C). Do oglądania cienkich skrawków tkanek używa się *transmisyjnego mikroskopu elektronowego*. Natomiast *skaningowy mikroskop elektronowy* służy do oglądania szczegółów powierzchni komórek i innych struktur (patrz panel 1-1, s. 4-5). Jednak nawet najsilniejsze mikroskopy elektronowe nie mogą ukazać pojedynczych atomów budujących cząsteczki (rys. 1-6).

Rys. 1-6. **Skala porównawcza pomiędzy żywymi komórkami a atomami.** Każda kolejna część rysunku przedstawia obraz 10-krotnie powiększony w stosunku do poprzedniego i ilustruje stopniowe wgłębianie się w szczegóły struktury: począwszy od kciuka poprzez komórki skóry do rybosomu i grupy atomów tworzących fragment jakiejś cząsteczki białka w naszym ciele. Szczegóły budowy molekularnej przedstawionej w ostatnich dwóch częściach rysunku są poniżej zdolności rozdzielczej mikroskopu elektronowego

Komórka eukariotyczna

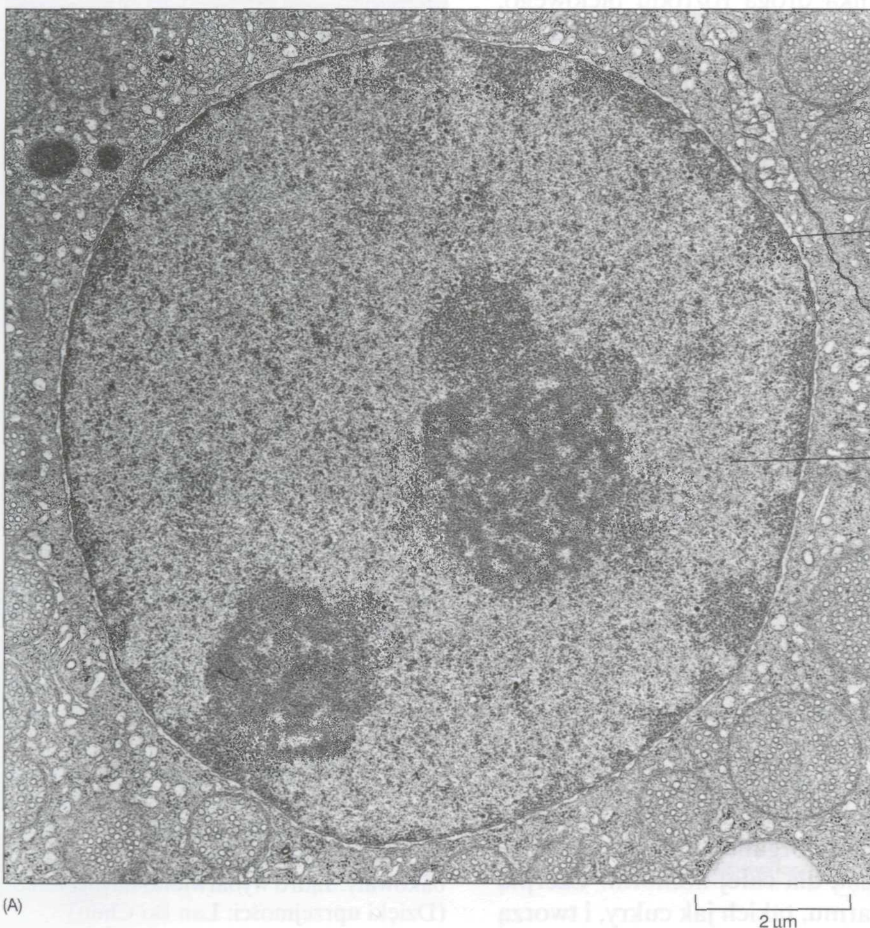
Różne komórki mogą zawierać te same organelle w odmiennych proporcjach. Obszerna i ewolucyjnie pierwotna klasa komórek, *bakterie*, nie mają organelli, ani nawet jądra. Właśnie obecność lub brak jądra stanowi podstawę prostej, lecz podstawowej klasyfikacji wszystkich żywych organizmów. Te, których komórki mają jądro, określa się jako **eukariota** (grec. eu —„prawdziwie" i karyon — „ziarno" lub „jądro"). Organizmy, których komórki nie mają jądra, to **prokariota** (grec. pro — „przed"). Nazw „bakterie" i „prokariota" używa się wymiennie. Większość prokariota istnieje jako organizmy jednokomórkowe, aczkolwiek pewne z nich tworzą łańcuchy, grona lub inaczej zorganizowane struktury wielokomórkowe. Wszystkie bardziej złożone organizmy wielokomórkowe — rośliny, zwierzęta i grzyby — utworzone są z komórek eukariotycznych. Eukariotami są również liczne organizmy jednokomórkowe, od drożdży do pierwotniaków (rys. 1-7). Obecność jądra w komórce łączy się zawsze z obecnością różnych innych organelli i tutaj zajmiemy się właśnie ich wyglądem w komórce eukariotycznej.

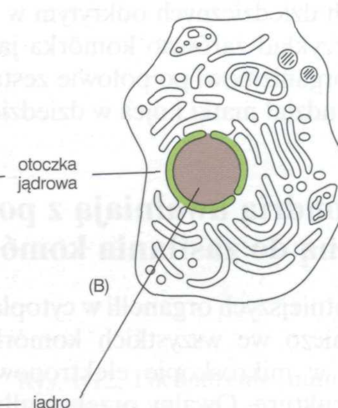


Rys. 1-7. Komórki drożdży widziane w mikroskopie świetlnym. Komórki pokazanego tu gatunku powodują rośnięcie ciasta i powstawanie wina z soku winogron. Mnożą się przez pączkowanie: asymetryczny podział na mniejszą i większą komórkę potomną

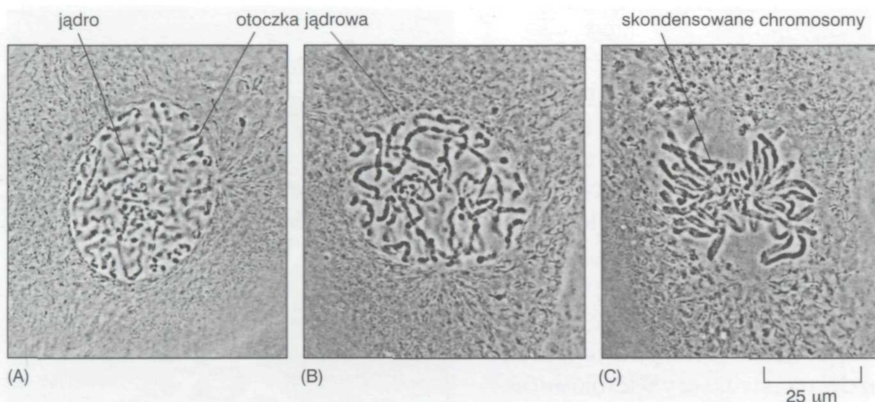
Jądro jest magazynem informacji w komórce

Jądro jest zazwyczaj największą organellą w komórce eukariotycznej (rys. 1-8). Jest ono zawarte w obrębie dwóch współśrodkowych błon, które tworzą *otoczkę jądrową* (osłonkę, błonę jądrową), i zawiera cząsteczki DNA — niezwykle długie polimery kodujące genetyczny zestaw cech organizmu. Te ogromne cząsteczki stają się widzialne





Rys. 1-8. Jądro komórkowe. (A) Organella, zawierająca większość DNA komórki eukariotycznej, widoczna jest tutaj w cienkim skrawku komórki ssaka oglądanej w mikroskopie elektronowym. Poszczególne chromosomy są niewidoczne, ponieważ DNA jest w tym stadium wzrostu komórki rozproszony w postaci cienkich nici po całym obszarze jądra. (B) Na tym schemacie typowej komórki zwierzęcej, ilustrującym rozległy system obłonionych organelli, jądro oznaczono kolorem *brązowym*, otoczkę jądrową — *zielonym*, pozostawiając *bezbarwną* cytoplazmę (wnętrze komórki poza jądrem). (A dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)



Rys. 1-9. Chromosomy w komórce zbliżającej się do podziału. W miarę jak komórka przygotowuje się do podziału, jej DNA kondensuje w nitkowate chromosomy, które są już widzialne w mikroskopie świetlnym. Fotografie pokazują trzy kolejne etapy tego procesu w hodowanych komórkach płuc traszki. (Dzięki uprzejmności: Conly L. Rieder)

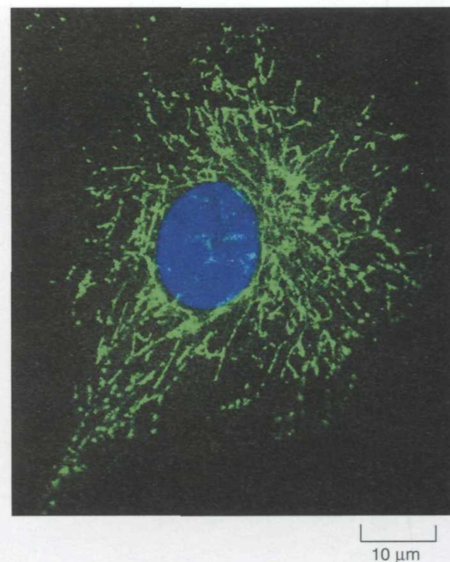
w mikroskopie świetlnym jako **chromosomy**, przybierając zwartą strukturę gdy komórka przygotowuje się do podziału na dwie komórki potomne (rys. 1-9). Również w komórkach prokariotycznych informacja genetyczna zmagazynowana jest w DNA, który jednak nie jest ograniczony otoczką jądrową, tak iż nie można w nich zobaczyć wyodrębnionego jądra.

Już na długo przed tym, nim zidentyfikowano DNA jako materiał genetyczny, uważne obserwacje prowadzone za pomocą mikroskopu świetlnego sugerowały, że chromosomy są nośnikami informacji genetycznej. Wszystkie komórki organizmów tej samej płci, należących do danego gatunku wykazywały identyczny zestaw chromosomów; np. muszka owocowa — 8, człowiek — 46, karp — 104, przy czym chromosomy te różniły się znacznie kształtem i wielkością od chromosomów innych gatunków. Co więcej, widziano, że podczas podziału na komórki potomne lub powstawania komórek jajowych i plemników, a także gdy łączyły się one w zygotę, co prowadzi do powstania nowego osobnika drogą rozrodu płciowego, rozmieszczanie chromosomów odpowiadało dokładnie zasadom przekazywania cech dziedzicznych odkrytym w XIX wieku przez Grzegorza Mendla. Na przykład zarówno komórka jajowa, jak i plemnikowa, dostarcza nowemu organizmowi po połowie zestawu chromosomów, odzwierciedlając równy udział matki i ojca w dziedziczeniu cech przez ich potomstwo.

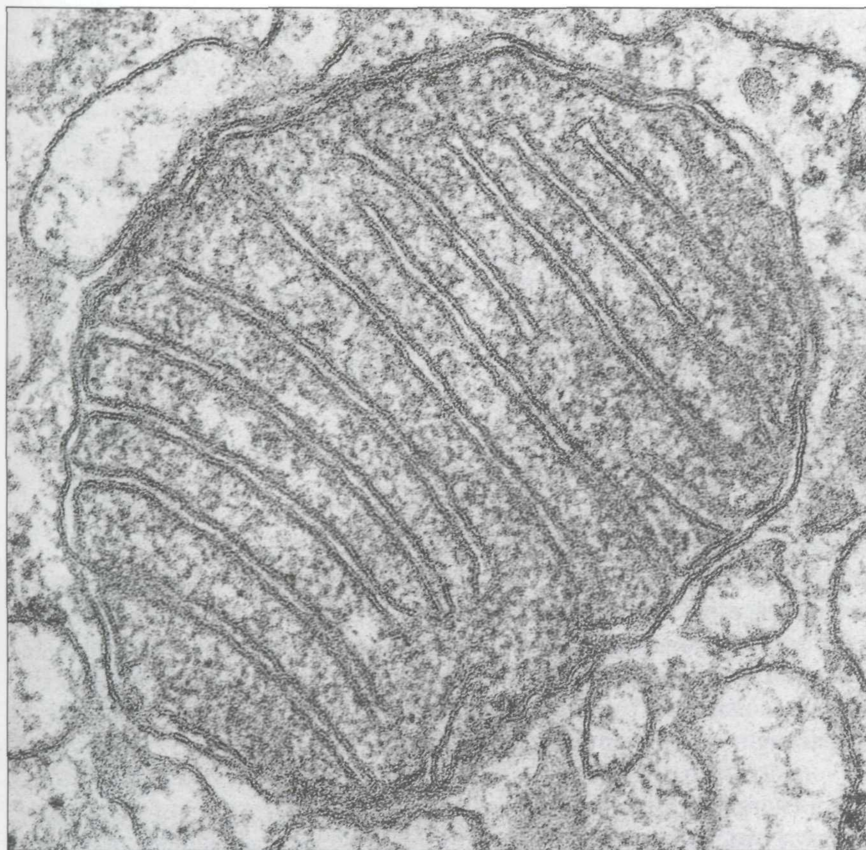
Mitochondria uwalniają z pokarmów energię potrzebną do zasilania komórki

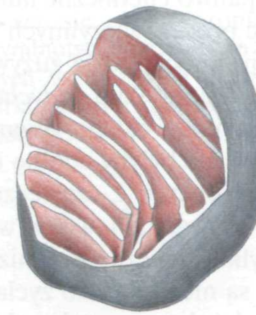
Do najistotniejszych organelli w cytoplazmie należą **mitochondria**, obecne zasadniczo we wszystkich komórkach eukariotycznych (rys. 1-10). Oglądane w mikroskopie elektronowym wykazują bardzo charakterystyczną strukturę. Owalny przekrój długości od 1 do kilku mikrometrów ujawnia, że każde mitochondrium odgraniczone jest od cytoplazmy dwiema odrębnymi błonami, z których wewnętrzna tworzy liczne pofałdowania wnikające w głąb organelli (rys. 1-11). Mitochondria zawierają własny DNA i odtwarzają się przez podział. Ze względu na ich liczne podobieństwa do bakterii uważa się, że mitochondria pochodzą od bakterii, które zostały wchłonięte przez praprzodków dzisiejszych komórek eukariotycznych (rys. 1-12).

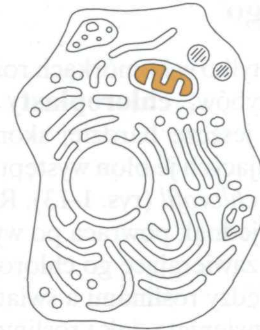
Same obserwacje mikroskopowe dają niewiele informacji o funkcjach mitochondriów. Funkcje te odkryto dopiero po rozbiciu komórek i odwirowaniu — z tak powstałego homogenatu — frakcji mitochondrialnej. W oczyszczonym preparacie mitochondrialnym badano, jakie procesy chemiczne mogą być przeprowadzane przez te organelle. Okazało się, że mitochondria wytwarzają energię chemiczną dla całej komórki. Czerpią one tę energię z utlenienia cząsteczek pokarmu, takich jak cukry, i tworzą



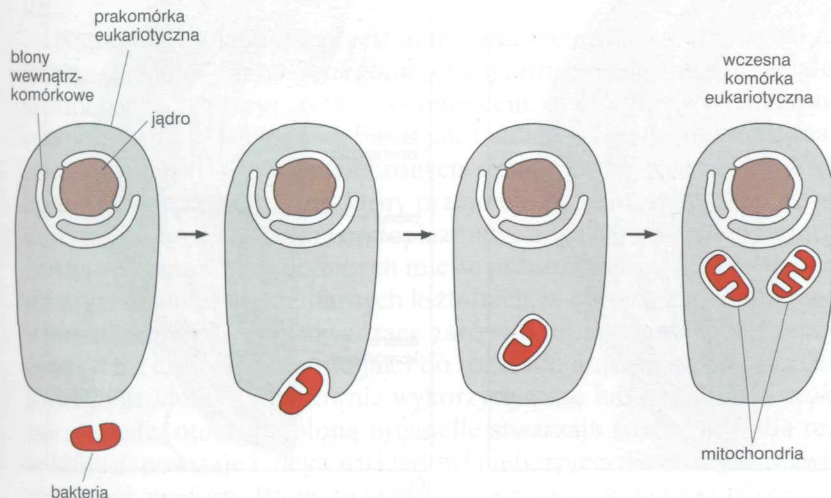
Rys. 1-10. Mitochondria widziane w mikroskopie świetlnym. Te organelle są generatorami mocy, utleniającymi cząsteczki substratów w celu uzyskania użytecznej energii chemicznej. Występują w prawie wszystkich komórkach eukariotycznych. Kształt mitochondriów jest bardzo różny; w pokazanej hodowanej komórce ssaka, wybarwione na *zielono* barwnikiem fluorescencyjnym, mają kształt robakowaty. Jądro wybarwiono na *niebiesko*. (Dzięki uprzejmności: Lan Bo Chen)







Rys. 1-11. Mitochondrium widziane w mikroskopie elektronowym. (A) Przekrój poprzeczny. (B) Trójwymiarowy model ukazujący układ błon mitochondrialnych. Błona zewnętrzna jest gładka, a wewnętrzna silnie pofałdowana. Błona wewnętrzna zawiera większość białek odpowiedzialnych za oddychanie komórkowe, a jej silne pofałdowanie ma na celu zwiększenie powierzchni dla tej funkcji. (C) Na schemacie komórki zabarwiono matriks mitochondrialną. (A dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)



Rys. 1-12. Pochodzenie mitochondriów. Przypuszcza się, że organelle te powstały z bakterii wchłoniętych przez prakomórkę eukariotyczną, które odtąd żyły w symbiozie ze swoim gospodarzem

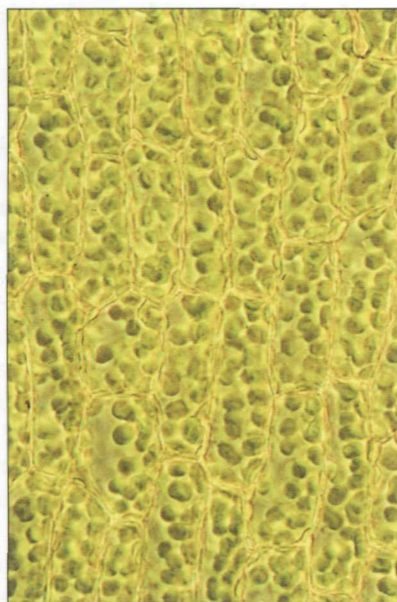
podstawowe paliwo chemiczne *adenozynotrifosforan*, czyli *ATP*, który zasila większość procesów czynnych w komórce. Ponieważ podczas pełnienia tej funkcji mitochondria zużywają tlen i uwalniają dwutlenek węgla, cały proces określono jako *oddychanie komórkowe*, z uwagi na podobieństwo do oddychania całego organizmu. Bez mitochondriów zwierzęta, grzyby i rośliny nie byłyby zdolne do użycia tlenu w celu uzyskania maksymalnej ilości energii z cząsteczek pokarmu. Organizmy, które mogą w ten sposób używać tlen, w tym wszystkie rośliny i zwierzęta, nazywa się *tlenowymi*. Tylko nieliczne organizmy eukariotyczne, podobnie jak wiele prokariotów, są niezdolne do życia w otoczeniu zawierającym tlen; określa się je jako *beztlenowe*, a charakteryzuje je brak mitochondriów.

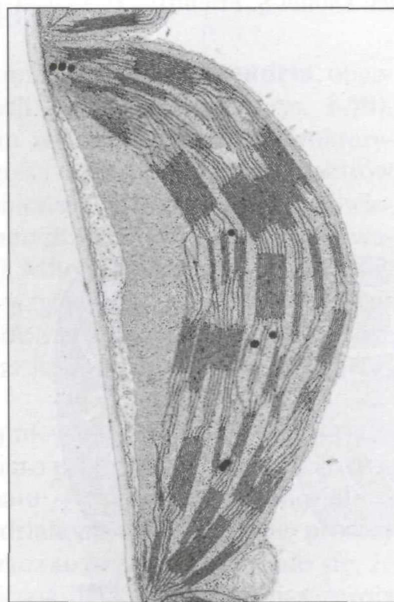
Pytanie 1-1. Rysunek 1-12 ułatwi odpowiedź na następujące pytania. Dlaczego mitochondrium ma dwie błony, zewnętrzną i wewnętrzną? Która z tych dwóch błon powinna — w sensie ewolucyjnym — pochodzić z błony komórkowej pradawnej komórki eukariotycznej? Na mikrografii elektronowej mitochondrium, podanej na rys. 1-11A, wskaż przestrzeń, która zawiera mitochondrialny DNA, tj. przestrzeń odpowiadającą cytozolowi bakterii, która została wchłonięta przez prakomórkę eukariotyczną przedstawioną na rys. 1-12.

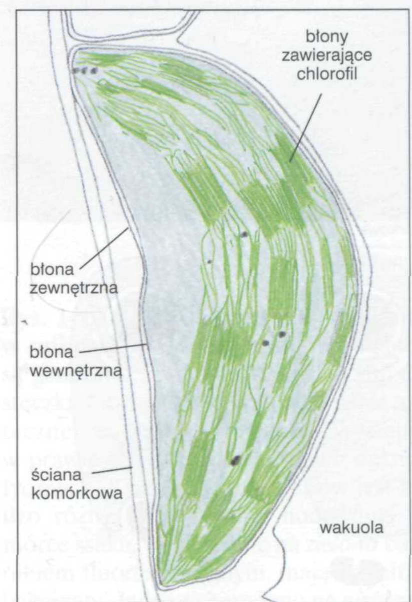
Chloroplasty wychwytują energię światła słonecznego

Znajdowane tylko w komórkach roślin (włącznie z glonami), ale nie zwierząt ani grzybów, **chloroplasty** są wielkimi zielonymi organellami o strukturze jeszcze bardziej skomplikowanej niż mitochondria. Obok dwóch otaczających je błon występują w nich stosy błon zawierających zielony barwnik *chlorofil* (rys. 1-13). Rośliny trzymane w ciemności tracą swą zieleń, która jednak powraca po wystawieniu ich na światło. Sugeruje to, że chlorofil i zawierające go chloroplasty są istotnym czynnikiem specjalnej relacji między roślinami a światłem.

Zarówno zwierzęta, jak i rośliny potrzebują energii do istnienia, wzrostu i rozmnażania się. Zwierzęta mogą wykorzystywać tylko energię chemiczną pobieraną z pokarmami, które są produktem innych organizmów. Natomiast rośliny mogą zdobywać energię bezpośrednio ze światła słonecznego, a organellami, które to umożliwiają, są właśnie chloroplasty. Z punktu widzenia istnienia życia na ziemi chloroplasty pełnią funkcję jeszcze bardziej istotną niż mitochondria: prowadzą *fotosyntezę*, to jest wychwytują cząsteczkami chlorofilu energię światła słonecznego i używają jej do wytwarzania bogatych w energię cząsteczek cukru. W procesie tym wydzielają tlen jako produkt uboczny. Następnie jednak komórki roślin mogą w miarę potrzeby wykorzystywać tę zmagazynowaną uprzednio

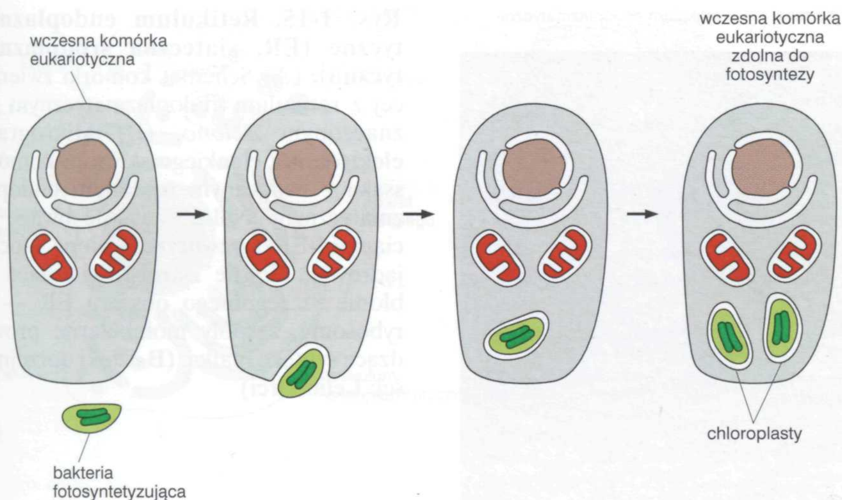

(A)


(B)



(C)

Rys. 1-13. Chloroplasty. Organelle te wychwytują w komórkach roślin energię światła słonecznego. (A) Komórki liścia mchu oglądane w mikroskopie świetlnym z widocznymi zielonymi chloroplastami. (B) Mikrografia elektronowa chloroplastu liścia trawy z widocznym rozległym systemem błon wewnętrznych. Spłaszczone pęcherzyki błonowe zawierają chlorofil i są ułożone w stosy. (C) Rysunek interpretujący (B). (B dzięki uprzejmości: Eldon Newcomb)



Rys. 1-14. Pochodzenie chloroplastów. Uważa się, że chloroplasty powstały z symbiotycznych bakterii fotosyntetyzujących wchłoniętych przez wczesne komórki eukariotyczne, już zawierające mitochondria

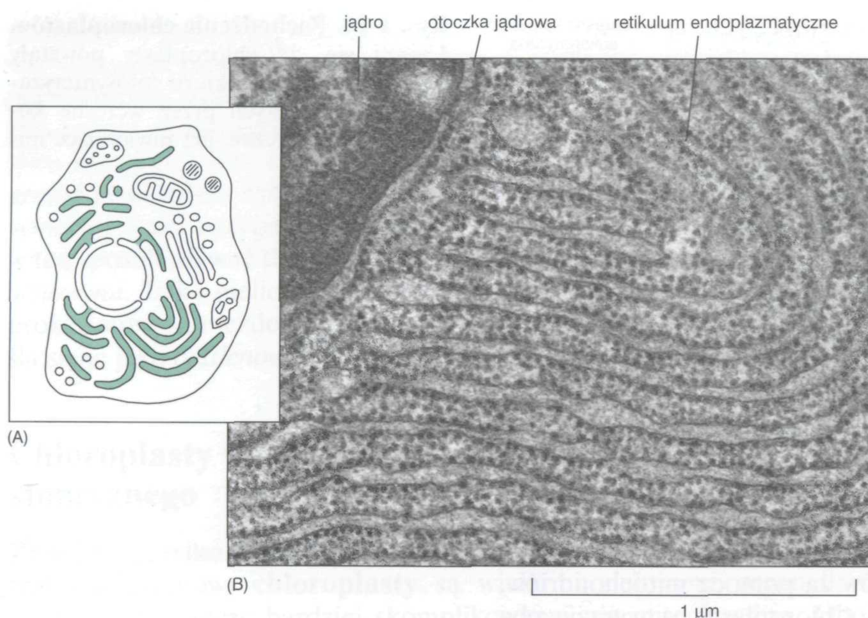
energię chemiczną przez utlenianie cukrów za pomocą mitochondriów, podobnie jak robią to komórki zwierząt. Chloroplasty wytwarzają oba składniki zużywane przez mitochondria: cząsteczki pokarmu i tlen.

Podobnie jak mitochondria, chloroplasty zawierają własny DNA i rozmnażają się przez podział. Uważa się, że powstały z bakterii fotosyntetyzujących, które w jakiś sposób zostały wchłonięte przez prymitywną prakomórkę eukariotyczną (rys. 1-14). Doprowadziło to najwyraźniej do związków *symbiotycznych*, w których eukariotyczny gospodarz i wchłonięta bakteria pomagały sobie wzajemnie we wspólnym przeżyciu i rozmnażaniu.

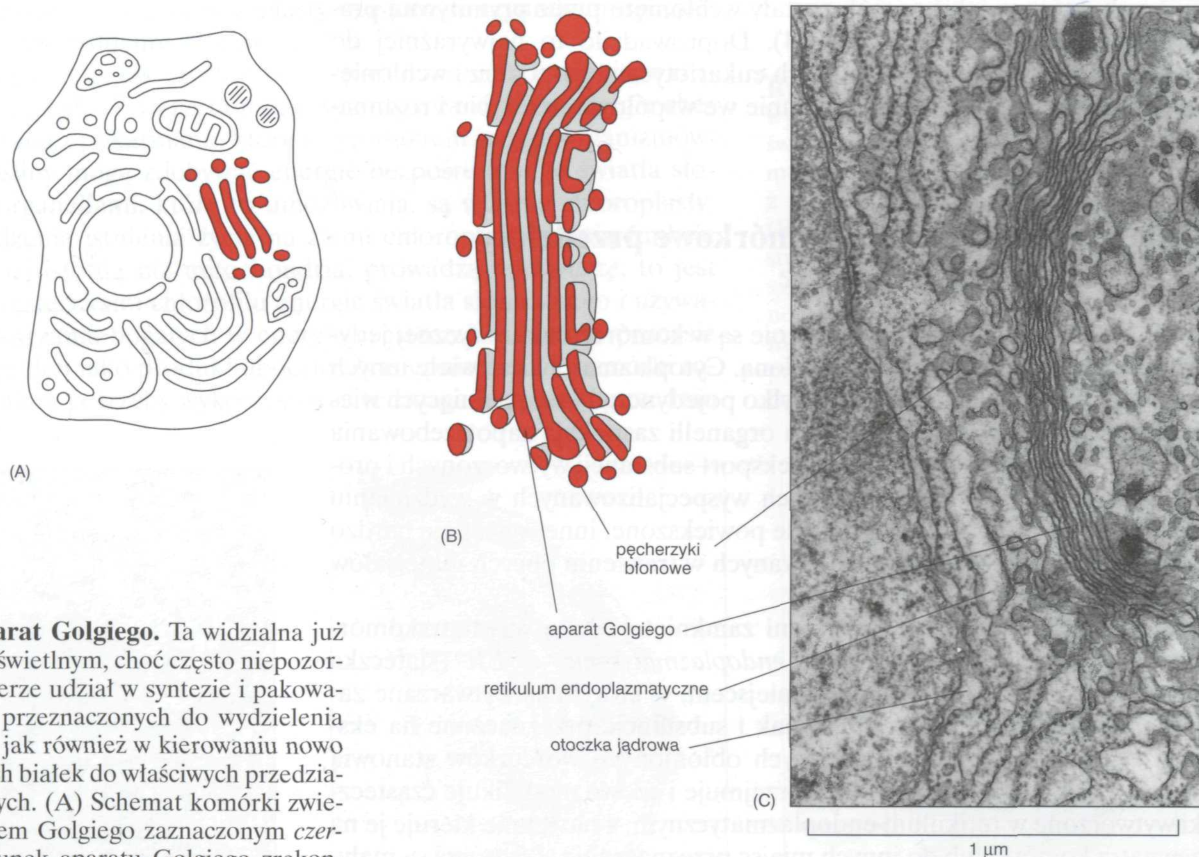
Błony tworzą wewnątrzkomórkowe przedziały pełniące odmienne funkcje

Jądra, mitochondria i chloroplasty nie są w komórce eukariotycznej jedynymi organellami ograniczonymi błoną. Cytoplazma zawiera wiele innych organelli, przeważnie otoczonych tylko pojedynczą błoną, pełniących wiele ważnych funkcji. Większość tych organelli zaspokaja zapotrzebowania komórki na import surowców oraz eksport substancji wytworzonych i produktów odpadowych. W komórkach wyspecjalizowanych w wydzielaniu białek pewne organelle są niezwykle powiększone, inne występują bardzo licznie w komórkach wyspecjalizowanych w trawieniu obcych materiałów itd.

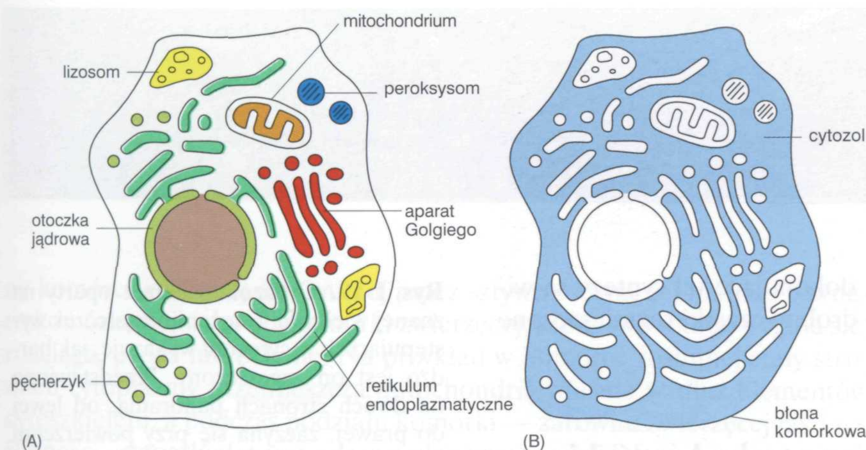
Nieregularny labirynt przestrzeni zamkniętej błoną wewnątrzkomórkową, określany jako *retikulum endoplazmatyczne* — *ER* (siateczka śródplazmatyczna; rys. 1-15) jest miejscem, w którym są wytwarzane zarówno składniki większości błon, jak i substancje przeznaczone na eksport z komórki. Stosy spłaszczonych obłonionych woreczków stanowią *aparat Golgiego* (rys. 1-16), który przejmuje i często modyfikuje cząsteczki wytworzone w retikulum endoplazmatycznym, a następnie kieruje je na zewnątrz komórki lub do innych miejsc przeznaczenia. *Lizosomy* są małymi organellami o nieregularnych kształtach, w których zachodzi trawienie wewnątrzkomórkowe prowadzące zarówno do uwolnienia substancji odżywczych z cząstek pokarmu jak i do rozkładu cząsteczek niepożądanych, którego produkty są ponownie wykorzystywane lub wydalane. *Peroksysomy* — małe, otoczone błoną organelle stwarzają środowisko dla reakcji, w których powstaje i ulega rozkładowi niebezpiecznie reaktywny związek, nadtlenek wodoru. Błony tworzą również małe *pęcherzyki* różnego typu,



Rys. 1-15. Retikulum endoplazmatyczne (ER, siateczka śródplazmatyczna). (A) Schemat komórki zwierzęcej z retikulum endoplazmatycznym zaznaczonym *zielono.* (B) Mikrografia elektronowa cienkiego skrawka komórki ssaka z widocznym retikulum endoplazmatycznym. Należy zwrócić uwagę na ciągłość ER z zewnętrzną błoną otoczki jądrowej. Czarne ziarnistości leżące na błonie szczególnego obszaru ER — to rybosomy, zespoły molekularne prowadzące syntezę białka. (B dzięki uprzejmości: Lelio Orci)



Rys. 1-16. Aparat Golgiego. Ta widzialna już w mikroskopie świetlnym, choć często niepozorna organella bierze udział w syntezie i pakowaniu cząsteczek przeznaczonych do wydzielenia poza komórkę, jak również w kierowaniu nowo syntetyzowanych białek do właściwych przedziałów komórkowych. (A) Schemat komórki zwierzęcej z aparatem Golgiego zaznaczonym *czerwono.* (B) Rysunek aparatu Golgiego zrekonstruowany z obrazu uzyskanego w mikroskopie elektronowym. Aparat składa się ze spłaszczonych woreczków błonowych, które są ułożone w warstwy i z których odpączkowują drobne pęcherzyki błonowe. W jednej komórce może być kilka takich struktur. (C) Mikrografia elektronowa aparatu Golgiego z typowej komórki zwierzęcej. (C dzięki uprzejmości: Brij J. Gupta)



Rys. 1-17. Błony wewnątrzkomórkowe i cytozol. (A) W obrębie komórek eukariotycznych istnieją różnorodne przedziały zamknięte błonami, każdy wyspecjalizowany w odmiennej funkcji. (B) Reszta komórki po wykluczeniu tych organelli, to cytozol, w którym przebiega wiele ważnych procesów komórkowych

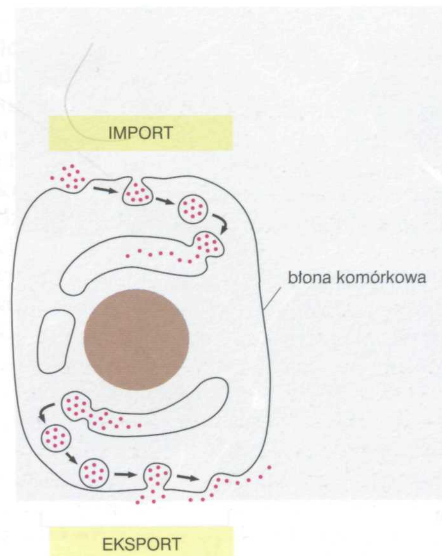
biorące udział w transporcie materiałów pomiędzy organellami otoczonymi pojedynczą błoną. Cały taki system powiązanych ze sobą organelli przedstawiono na rys. 1-17A.

Pomiędzy *retikulum endoplazmatycznym*, *aparatem Golgiego*, *lizosomami* i otoczeniem komórki zachodzi stała wymiana materiałów. Pośredniczą w niej małe pęcherzyki błonowe, które odrywają się od błony jednej organelli i ulegają fuzji z błoną innej organelli. Na przykład na powierzchni komórki fragmenty błony komórkowej ulegają wpukleniu do wnętrza komórki (inwaginacji) i odrywają się od pozostałej błony tworząc pęcherzyki wprowadzające do komórki materiał zagarnięty z zewnętrznego środowiska (rys. 1-18). Pęcherzyki te zazwyczaj ulegają fuzji z lizosomami, gdzie przechwycony materiał zostaje strawiony. W ten sposób mogą zostać do komórki zwierzęcej wchłonięte bardzo duże cząstki, a nawet całe obce komórki. Częstą funkcją komórki jest również proces odwrotny, w którym pęcherzyki pochodzące z wnętrza komórki ulegają fuzji z błoną komórkową, wydzielając swą zawartość do środowiska zewnętrznego (patrz rys. 1-18).

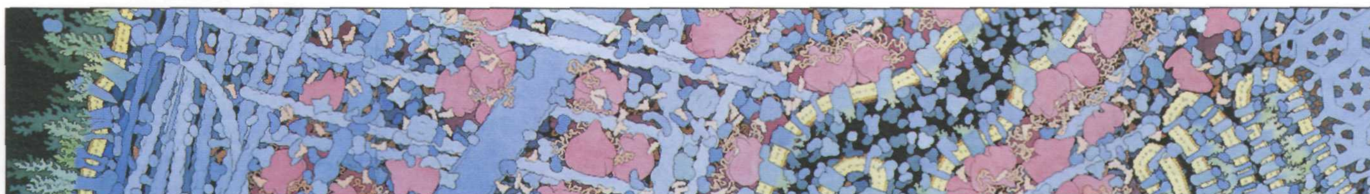
Pytanie 1-2. Zaproponuj przyczynę, dla której korzystne dla komórek eukariotycznych było ewolucyjne rozwinięcie skomplikowanego systemu błon wewnętrznych, które pozwalają tym komórkom wprowadzić substancje z zewnątrz, jak pokazano na rys. 1-18.

Cytozol jest zagęszczonym żelem wodnym wielkich i małych cząsteczek

Gdybyśmy zerwali z komórki eukariotycznej błonę komórkową i usunęli wszystkie błonowe organelle łącznie z mitochondriami i chloroplastami, pozostałby nam **cytozol** (rys. 1-17B). W większości komórek jest to największy przedział, a w bakteriach przedział jedyny. Zawiera on ogromną ilość wielkich i małych cząsteczek występujących tak gęsto, że jego właściwości bardziej przypominają uwodniony żel niż ciekły roztwór (rys. 1-19). Cytozol jest miejscem, w którym przebiega wiele reakcji chemicznych podstawowych dla istnienia komórki; na przykład rozkład cząsteczek pokarmowych i jeden z kluczowych procesów — *synteza białek*.



Rys. 1-18. Import i eksport. Komórki mogą importować materiały z otaczającego środowiska przez zamykanie ich w obrębie pęcherzyków, które odpączkowują od błony komórkowej. Pęcherzyki te ulegają ostatecznie fuzji z lizosomami, w których przebiega trawienie wewnątrzkomórkowe. Przez odwrotny proces komórki eksportują materiały, które wytworzyły na drodze syntezy w przedziałach wewnątrzkomórkowych; matriały te są przechowywane w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach i uwalniane do środowiska w wyniku fuzji pęcherzyków z błoną komórkową



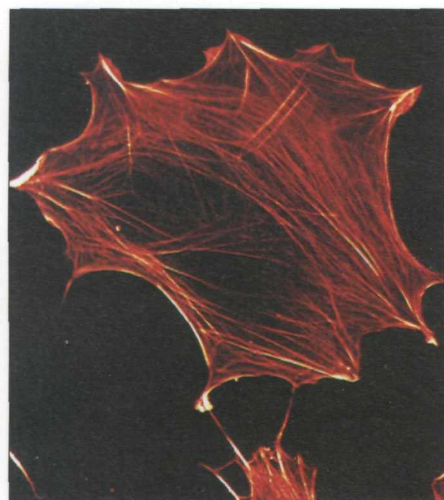
Małe maszyny molekularne — rybosomy, dokonujące tej syntezy są widoczne w mikroskopie elektronowym jako drobne cząstki rozmieszczone w cytozolu (patrz rys. 1-5B i 1-15B).

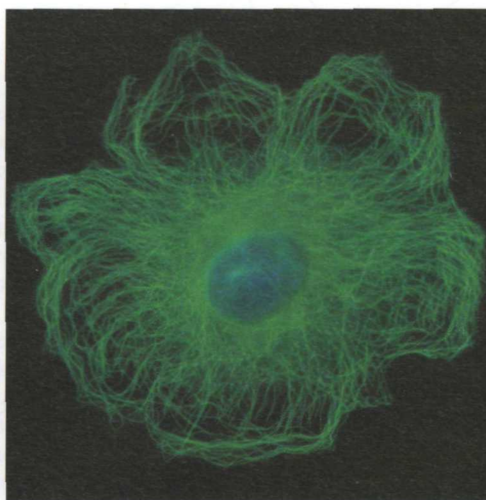
Rys. 1-19. Cytozol. Schemat oparty na znanej wielkości i stężeniu cząsteczek występujących w cytozolu wykazuje, jak bardzo jest on zagęszczony. Przedstawiona na dwóch stronach panorama, od lewej do prawej, zaczyna się przy powierzchni komórki, przechodzi przez retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego i mitochondrium, a kończy się w jądrze. (Dzięki uprzejmości: D. Goodsell)

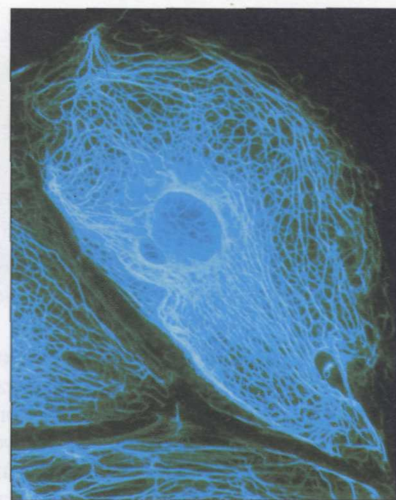
Cytoszkielet jest odpowiedzialny za ruchy komórki

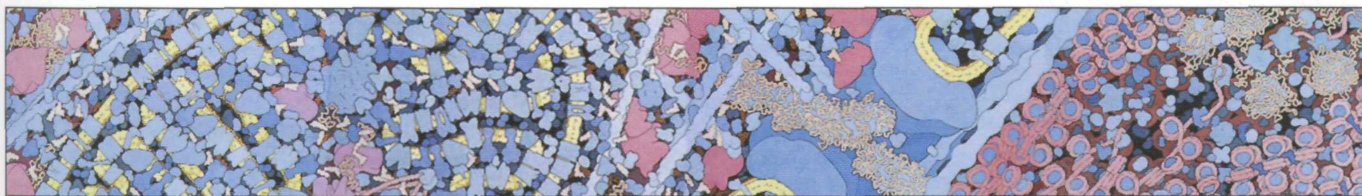
Cytozol nie jest bezstrukturalnym roztworem związków chemicznych. W mikroskopie elektronowym można zaobserwować, że w komórkach eukariotycznych (ale nie u bakterii) krzyżują się lub w różnych kierunkach przebiegają długie, cienkie włókna białkowe. Często można obserwować, że włókna te są zakotwiczone jednym końcem w błonie komórkowej lub rozchodzą się promieniście z centralnego miejsca w pobliżu jądra. Ten system włókien (filamentów) nazywa się **cytoszkieletem** (rys. 1-20). Najcieńsze są *filamenty aktynowe*, obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych, ale specjalnie liczne w komórkach mięśniowych, gdzie stanowią część struktury wytwarzającej siłę skurczu. Najgrubsze włókna określa się jako *mikrotubule*, ponieważ mają kształt miniaturowych rurek. Podczas podziału komórki mikrotubule ulegają reorganizacji w charakterystyczny układ przestrzenny, który pomaga odciągnąć podwojone chromosomy w przeciwnych kierunkach i równomiernie rozdzielić je do dwóch komórek potomnych (rys. 1-21). Grubość pośrednią pomiędzy filamentami aktynowymi a mikrotrubulami mają *filamenty pośrednie*, których funkcją jest mechaniczne wzmocnienie komórki. Te trzy wymienione typy filamentów, wraz z innymi dołączonymi do nich białkami, tworzą system beleczek, sznurów i „motorów", które nadają komórce odporność mechaniczną, warunkują jej kształt oraz zarówno umożliwiają, jak i ukierunkowują jej ruchy. Ponieważ aparat ten decyduje zarówno o wewnętrznej organizacji komórki, jak i o jej zewnętrznym zachowaniu się, jest tak samo niezbęd-

Rys. 1-20. Cytoszkielet. Białkowe filamenty wytwarzają we wszystkich komórkach eukariotycznych rodzaj wewnętrznego rusztowania, które pomaga w organizowaniu procesów wewnątrzkomórkowych, a równocześnie warunkuje ruchy i zmiany kształtu komórki. Pokazano tu, w komórkach hodowanych *in vitro* (A) filamenty aktynowe, (B) mikrotubule i (C) filamenty pośrednie. Różne typy filamentów uwidoczniono używając różnych barwników fluorescencyjnych. (Dzięki uprzejmości: A — Simon Barry, Chris D'Lacey; B — Nancy Kedersha; C — Clive Lloyd)









ny komórce roślinnej zamkniętej przez sztywną ścianę jej matriks zewnątrzkomórkowej, jak i dla komórki zwierzęcej, która swobodnie wygina się, rozciąga, pływa lub pełznie. Na przykład w komórce roślinnej stały strumień cytoplazmy przemieszcza mitochondria właśnie wzdłuż elementów cytoszkieletu, a podczas podziału komórki — zarówno zwierzęcej jak i roślinnej — cytoszkielet jest odpowiedzialny za rozdzielenie wewnętrznych składników do dwóch komórek potomnych. W panelu 1-2, na następnej stronie, zestawiono różnice między komórką zwierzęcą, roślinną i bakteryjną, a w tab. 1-1, na s. 19, podano ważne daty związane z odkryciem komórek i ich organelli.

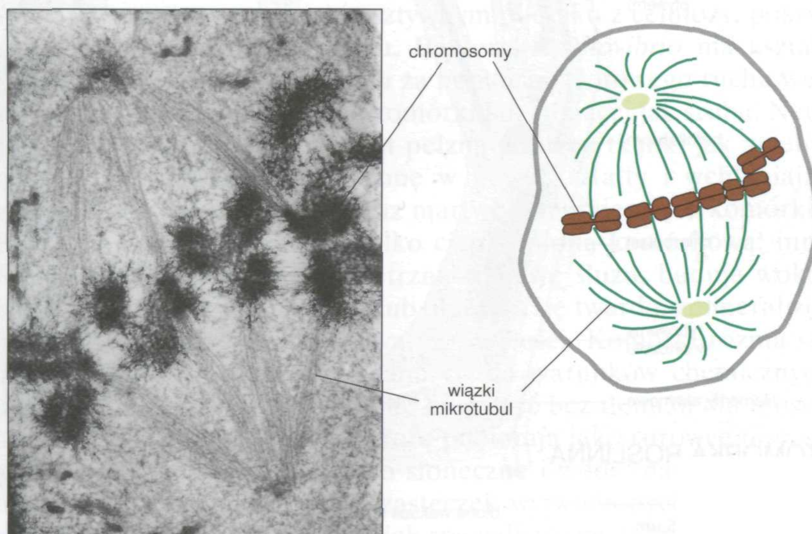
Pytanie 1-3. Omów zalety oraz wady mikroskopii świetlnej i elektronowej. Jak można by najlepiej zobaczyć a) żywą komórkę skóry, b) mitochondrium drożdży, c) bakterię, d) mikrotubulę?

Jedność i różnorodność komórek

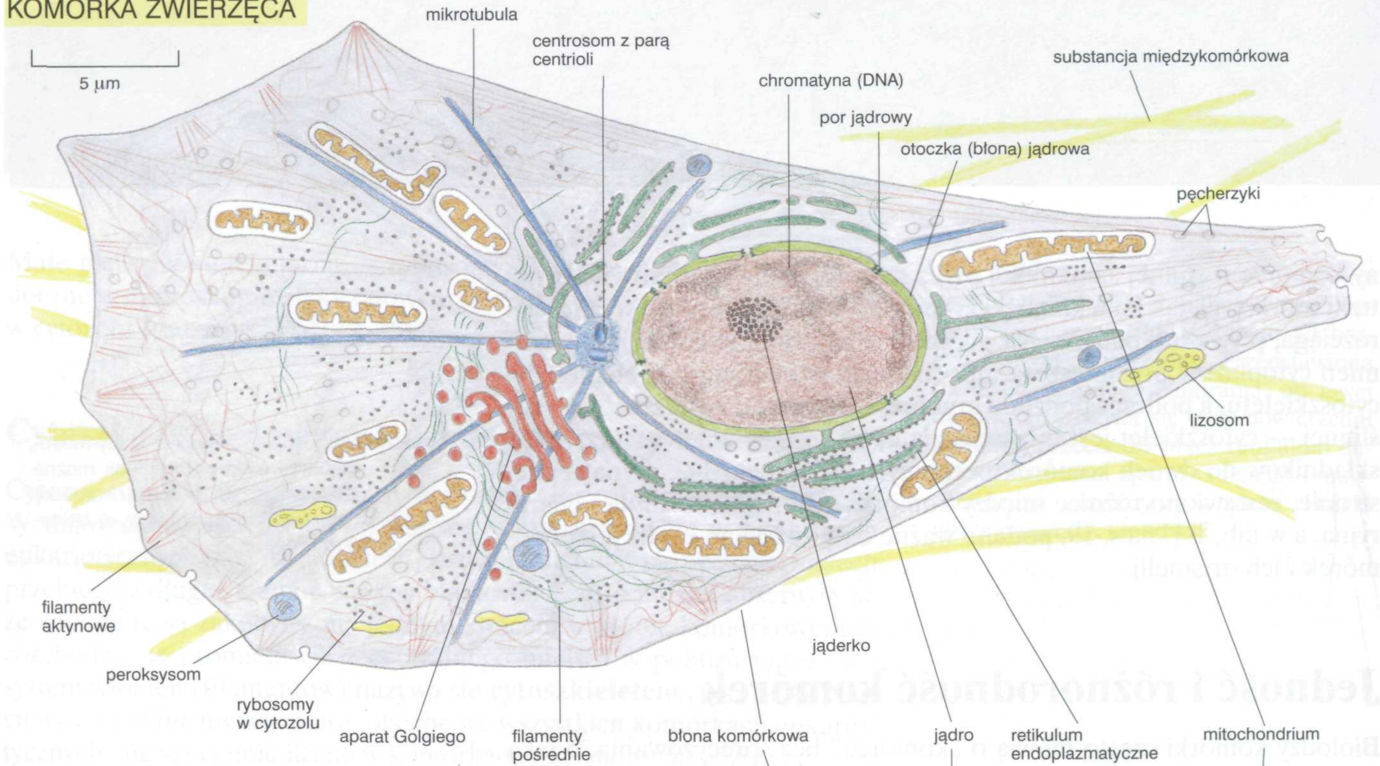
Biolodzy komórki często mówią o „komórce" bez sprecyzowania, o jaką komórkę chodzi, tak jakby wszystkie komórki były do siebie podobne. Jednakże, jak już wspomniano, tak nie jest i komórki mogą się między sobą ogromnie różnić. Obliczono, że na świecie istnieje przynajmniej 10 milionów gatunków organizmów, a może ich liczba sięga nawet 100 milionów. Zanim zagłębimy się w biologię komórki, należy się zastanowić, jak wiele wspólnego mają komórki takich organizmów, jak bakteria i motyl lub róża i delfin — i czym się różnią od siebie?

Komórki różnią się niezmiernie wyglądem i funkcją

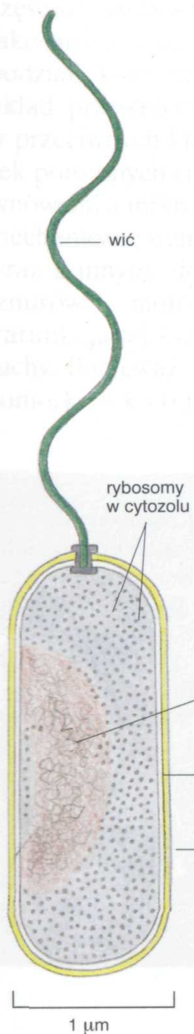
Rozpocznijmy od wielkości. Komórka bakteryjna — np. *Lactobacillus* w kawałku sera — ma kilka mikrometrów długości. Z kolei jajo żaby, które jest też pojedynczą komórką, ma średnicę około 1 mikrometra. Je-



Rys. 1-21. Rola mikrotubul w podziale komórki. Gdy komórka dzieli się, jej otoczka jądrowa rozpada się, a DNA kondensuje w pary widzialnych chromosomów, które zostają przez mikrotubule odciągnięte od siebie do rozdzielanych komórek. Mikrotubule rozchodzą się promieniście od miejsc leżących na przeciwległych końcach dzielącej się komórki. (Dzięki uprzejmości: Conly L. Rieder)



Trzy typy komórek narysowano tutaj w sposób bardziej realistyczny niż schemat podany na rys. 1-17. Użyto jednak tych samych kolorów, aby wyróżnić główne składniki komórki. Rysunek komórki zwierzęcej oparto na fibroblaście, komórce pełzającej w tkance łącznej i odkładającej na zewnątrz substancję (matriks) międzykomórkową. Mikrofotografię żywego fibroblastu pokazano na rys. 1-4A. Rysunek komórki roślinnej przedstawia typową komórkę młodego liścia, zawierającą chloroplasty i duże, wypełnione płynem wakuole. Jako bakterię przedstawiono pałeczkowaty *Bacillus* z pojedynczą wicią umożliwiającą ruchliwość



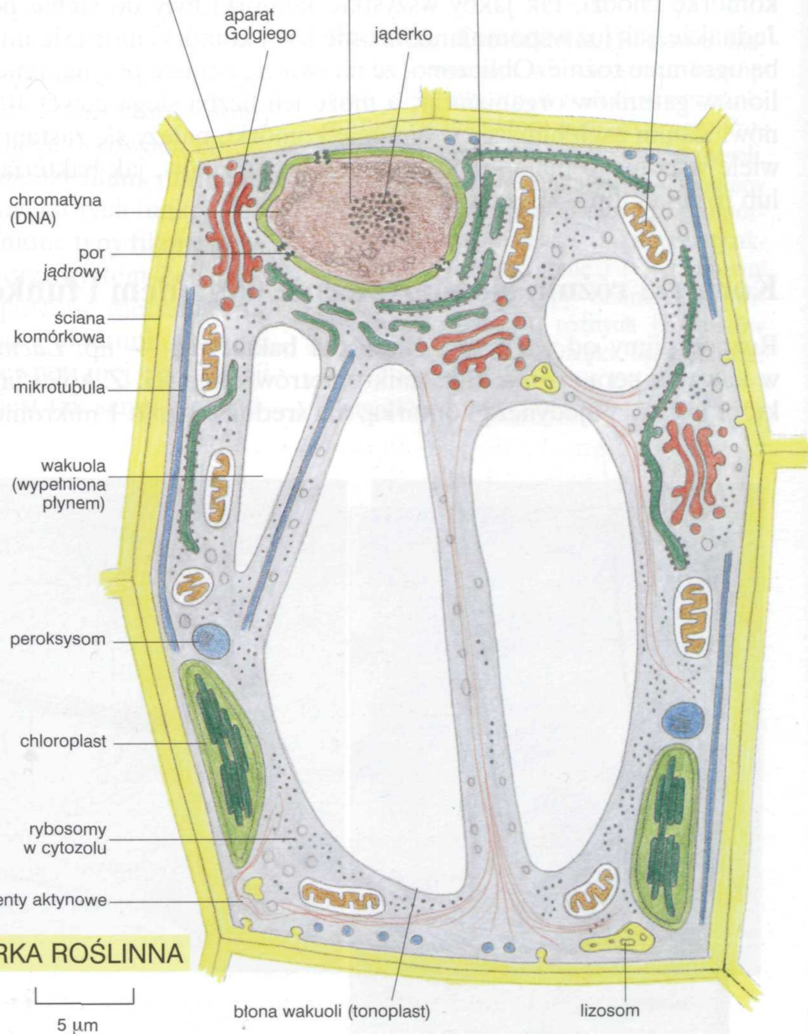


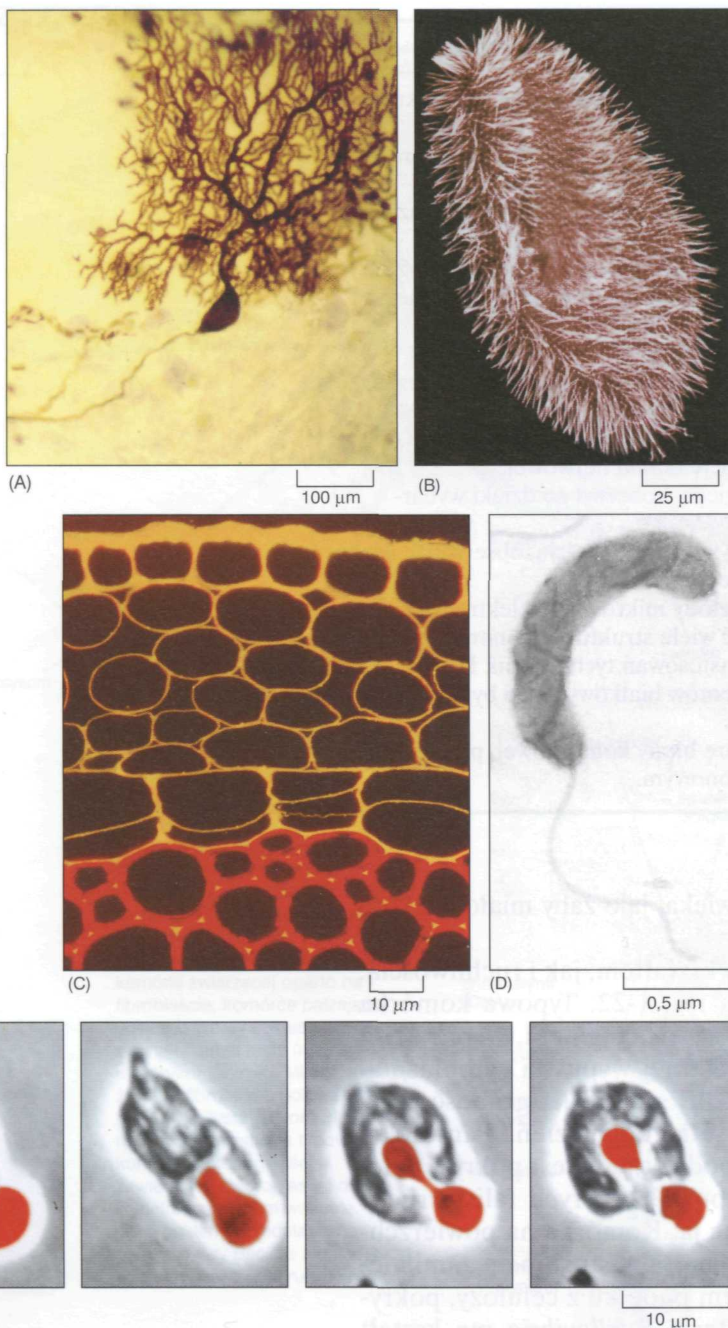
Tabela 1-1. Przełomowe daty w dziedzinie mikroskopii komórek

1655	**Hooke** użył prymitywnego mikroskopu do opisu małych klatek w przekroju korka, którym dał nazwę „komórki".
1674	**Leeuwenhoek** ogłosił swoje odkrycie pierwotniaków. Dziewięć lat później zobaczył po raz pierwszy bakterie.
1833	**Brown** opublikował swoje mikroskopowe obserwacje storczyków, wyraźnie opisując jądro komórkowe.
1838	**Schleiden** i **Schwann** zaproponowali teorię komórkową stwierdzając, że zawierająca jądro komórka jest uniwersalnym elementem budowy tkanek roślin i zwierząt.
1857	**Kölliker** opisał mitochondria w komórkach mięśni.
1879	**Flemming** bardzo wyraźnie opisał zachowanie się chromosomów podczas mitozy w komórkach zwierząt.
1881	**Cajal** i inni histologowie opracowali metody barwienia, które ujawniły strukturę komórek nerwowych i organizację tkanki nerwowej.
1898	**Golgi** po raz pierwszy opisał aparat Golgiego; zobaczył go dzięki wybarwieniu komórek azotanem srebra.
1902	**Boveri** odkrył powiązania chromosomów z dziedzicznością, obserwując ich zachowanie podczas rozmnażania płciowego.
1952	**Palade**, **Porter** i **Sjöstrand** rozwinęli metody mikroskopii elektronowej, które pozwoliły po raz pierwszy zobaczyć wiele struktur wewnątrzkomórkowych. W jednym z najwcześniejszych zastosowań tych technik **Huxley** wykazał, że mięsień zawiera układ filamentów białkowych, co było pierwszym dowodem istnienia cytoszkieletu.
1957	**Robertson** opisał dwuwarstwową strukturę błony komórkowej, po raz pierwszy oglądanej w mikroskopie elektronowym.

śli przyjąć dla *Lactobacillus* wielkość człowieka, jajo żaby miałoby około kilometra średnicy.

Komórki różnią się ogromnie zarówno kształtem, jak i ruchliwością. Przyjrzyjmy się zestawieniu komórek na rys. 1-22. Typowa komórka nerwowa mózgu człowieka jest niezwykle rozciągnięta, a przy tym przesyła sygnały elektryczne wzdłuż delikatnej wypustki cytoplazmatycznej (aksonu), która jest 10 000 razy dłuższa niż jej grubość, a na swym dalekim końcu rozdziela się na setki odgałęzień. Pantofelek w kropli wody ze stawu ma kształt łodzi podwodnej i jest pokryty dziesiątkami tysięcy *rzęsek*, włosowatych wypustek, których faliste ruchy przesuwają komórkę do przodu obracając ją. Komórka na powierzchni rośliny jest przysadzistym, nieruchomym graniastosłupem zamkniętym w wytworzonym przez siebie sztywnym pudełku z celulozy, pokrytym wodoodporną warstwą wosku. Bakteria *Bdellovibrio* ma kształt torpedy poruszającej się do przodu za pomocą obrotowego ruchu wici umieszczonej na tylnym biegunie komórki i działającej jak śruba. Neutrofile i makrofagi w ciele zwierząt pełzną poprzez tkanki jak ameby, ustawicznie przelewając swą plazmę w nowe kształty i wchłaniając szczątki, obce mikroorganizmy oraz martwe i obumierające komórki.

Pewne komórki otoczone są tylko cienką błoną komórkową; inne wytwarzają na powierzchni zewnętrzną warstwę śluzu, budują wokół siebie sztywną ścianę komórkową lub otaczają się twardą, zmineralizowaną substancją międzykomórkową, np. w kości. Komórki różnią się także niezmiernie swoimi wymogami co do warunków chemicznych oraz rodzajem aktywności. Jedne nie mogą żyć bez tlenu, a dla innych tlen jest śmiertelną trucizną. Niektóre pobierają jako surowce niewiele więcej ponad powietrze, światło słoneczne i wodę, natomiast inne potrzebują złożonej mieszaniny cząsteczek wytworzonych przez inne komórki. Pewne komórki działają jak specjalistyczne fabryki produku-



Rys. 1-22. Przykłady różnorodności kształtu i wielkości komórek. (A) Komórka nerwowa z móżdżku (część mózgu kontrolująca ruchy). Komórka ta ma niezwykle rozgałęzione wypustki w kształcie ogromnego drzewka, przez które odbiera sygnały od około 100 000 innych komórek nerwowych. (B) *Paramecium;* pierwotniak ten pływa za pomocą rzęsek, które pokrywają jego powierzchnię i poruszają się ruchem wiosłowym. (C) Przekrój młodego pędu rośliny, w którym celulozę wybarwiono *pomarańczowo* a ligninę *czerwono.* Powierzchniowa warstwa komórek jest u góry zdjęcia. (D) Maleńka bakteria *Bdellovibrio bacteriovorus* z pojedynczą wicią; bakteria ta atakuje i zabija inne większe bakterie, żywiąc się nimi. (E) Biała krwinka człowieka (neutrofil) zbliżająca się do erytrocytu i wchłaniająca go. (Dzięki uprzejmości: A — Constantino Sotelo, B — Anne Fleury, Michel Laurent, André Adoutte, D — M.A. Stein i D.L. Diedrich, E — Stephen E. Malawista, Anne de Boisfleury Chevance)

jące określone substancje, takie jak hormony, skrobię, tłuszcz, sok mleczny (lateks) lub barwniki. Komórki mięśniowe są maszynami zużywającymi paliwo do wykonania pracy mechanicznej, a inne — generatorami elektryczności, jak zmodyfikowane komórki mięśniowe węgorza elektrycznego.

Specjalizacja modyfikuje często komórkę tak dalece, że traci ona szansę podzielenia się. Taka specjalizacja byłaby bezsensowna dla organizmów jednokomórkowych. Jednakże w organizmach wielokomórkowych występuje między komórkami podział pracy, który pozwala pewnym komórkom skrajnie wyspecjalizować się w określonej funkcji, zarazem uzależniając je od innych komórek w zakresie wielu podstawowych wymagań. Nawet najbardziej podstawowa potrzeba, jaką jest przekazanie instrukcji genetycznych następnemu pokoleniu, została powierzona wyspecjalizowanym komórkom — jajowej i plemnikowej.

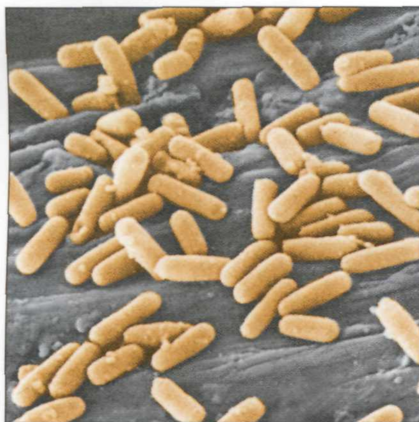
Funkcje wszystkich żywych komórek opierają się na podobnych podstawowych procesach chemicznych

Pomimo niezwykłej różnorodności roślin i zwierząt ludzie od niepamiętnych czasów rozumieli, że organizmy te łączy coś wspólnego, coś co pozwala nazwać je wszystkie organizmami żywymi. Z chwilą wynalezienia mikroskopu stało się jasne, że rośliny i zwierzęta są zespołami komórek, z których każda jest żyjącą indywidualnością oraz że pewne komórki mogą istnieć jako niezależne organizmy. Choć jednak łatwo było rozróżnić życie, pozostała trudność określenia, w czym wszystkie żywe organizmy są do siebie podobne. W podręcznikach starano się zdefiniować życie w ogólnych abstrakcyjnych pojęciach.

Odkrycia biochemii i biologii molekularnej spowodowały, że problem ten spektakularnie zniknął. Wiemy dziś, że wszystkie organizmy żyjące na naszej planecie są podobne do siebie nie tylko w sensie ogólnym — to znaczy, że rosną, mnożą się, przekształcają energię itd. — ale w zdumiewający sposób podobne w szczegółach chemicznych. We wszystkich organizmach instrukcje genetyczne — *geny* są zmagazynowane w cząsteczkach DNA, zapisane tym samym kodem chemicznym, zbudowane z tych samych podjednostek chemicznych, odczytywane zasadniczo tym samym systemem chemicznym i replikowane w ten sam sposób, pozwalający organizmom rozmnażać się. DNA kieruje produkcją ogromnie różnorodnych wielkich cząsteczek białka, które determinują zachowanie się komórki, służąc jako materiały strukturalne, katalizatory chemiczne, motory molekularne itd. W każdym organizmie białka powstają z połączenia tych samych 20 typów chemicznych podjednostek — aminokwasów. Jednak podjednostki te są połączone w różnych sekwencjach, nadając cząsteczkom białka różne właściwości chemiczne, tak jak kolejność liter nadaje różne znaczenia słowom. W ten właśnie sposób identyczna podstawowa maszyneria chemiczna posłużyła do powstania całej rozmaitości organizmów (rys. 1-23).

Wszystkie żyjące dziś komórki najwidoczniej powstały przez ewolucję tej samej prakomórki

Komórka reprodukuje się przez podwojenie jej DNA i następne rozdzielenie kopii instrukcji genetycznych, zakodowanych w DNA, do dwóch komórek potomnych. To decyduje o podobieństwie komórek potomnych do rodzicielskiej. Kopiowanie nie zawsze jest doskonałe i instrukcje są czasem zniekształcone, co powoduje, że komórki potomne nie zawsze są idealnie podobne do rodzicielskich. Zmiany w DNA — *mutacje* mogą powodować, że komórka potomna ma informację gorszą w tym sensie, że będzie mniej zdolna do przeżycia i rozmnażania. Może jednak dzięki mutacji otrzymać informację lepszą, co oznacza, że będzie łatwiej przeżywała i reprodukowała się. W końcu zmiana może być neutralna, wówczas komórka, chociaż odmienna, będzie równie żywotna. Walka o przeżycie wyeliminuje przypadek pierwszy, zwiększy szansę w przypadku drugim, a przypadek trzeci będzie tolerować na równych prawach. Którakolwiek z potomnych komórek przeżyje, przekaże następnemu pokoleniu tak zmienione instrukcje. Dodatkowo „karty genetyczne” mogą być przetasowane i inaczej rozdane przez *rozmnażanie płciowe*, w którym dwie komórki tego samego gatunku zlewają się, łącząc swoje DNA, co umożliwia wspólne korzystanie z obu zasobów informacji oraz ich nowe rekombinacje w następnym pokoleniu.


(A)


(B)


(C)


(D)

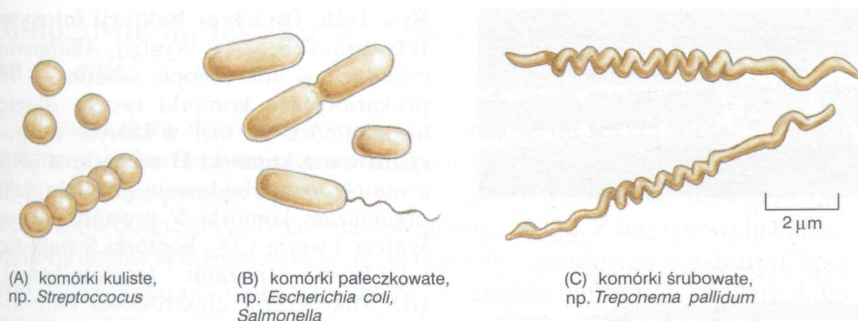
Rys. 1-23. Bakteria, motyl, róża i delfin. Wszystkie żywe organizmy zbudowane są z komórek, które mają podobny podstawowy skład chemiczny i działają według tych samych głównych zasad. (Dzięki uprzejmości: A — Tony Brain, Science Photo Library, B — J.S. i E.J. Woolmer © Oxford Scientific Films, C — John Innes Foundation, D — Jonathan Gordon, IFAW)

Zmienność i dobór powtarzające się według tych prostych zasad przez miliardy pokoleń komórek, są podstawą **ewolucji**, procesu w którym żywe organizmy ulegały stopniowej modyfikacji i przystosowaniu do otoczenia w coraz to bardziej przemyślny sposób. Ewolucja daje zaskakujące, ale przekonujące wyjaśnienie podobieństwa podstawowych zasad, na których działają dzisiejsze komórki: wszystkie one odziedziczyły instrukcje genetyczne po tej samej prakomórce. Uważa się, że istniała ona 3,5–3,8 miliardów lat temu i musiała zawierać prototyp uniwersalnej maszynerii wszelkich form życia istniejących dziś na Ziemi. Wskutek mutacji komórki potomne tej prakomórki ulegały stopniowemu zróżnicowaniu pozwalającemu im wypełnić każdy zakątek Ziemi organizmami wykorzystującymi potencjał tej maszynerii na nieskończenie różnorodne sposoby.

Pytanie 1-4. Mutacje są błędami w DNA, które zmieniają plan genetyczny działający w poprzednim pokoleniu. Wyobraź sobie fabrykę butów. Czy oczekiwałbyś, że błędy (tj. niezamierzone zmiany) w kopiowaniu wzoru buta doprowadzą do polepszenia wyrobu? Uzasadnij odpowiedź.

Bakterie są najmniejszymi i najprostszymi komórkami

Spośród dzisiejszych komórek **bakterie** mają najprostszą budowę i ukazują nam zjawisko życia sprowadzone do istotnych podstaw. Są zazwyczaj kuliste, pałeczkowate lub śrubowate o długości kilku mikrometrów (rys. 1-24). Często mają sztywny płaszcz ochronny, nazywany ścianą komórki, pod którym błona komórkowa zamyka pojedynczy przedział zawierający cytoplazmę, a w niej DNA. W mikroskopie elektronowym wnętrze takiej komórki wygląda jak matriks o różnej gęstości elektronowej bez jakiejkolwiek zorganizowanej wewnętrznej struktury (rys. 1-25).



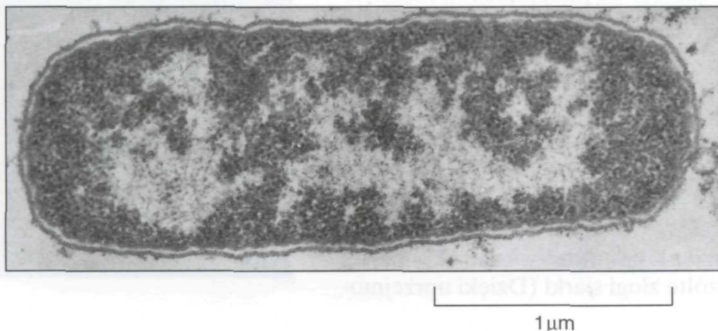
Rys. 1-24. Kształt i wielkość bakterii. Rysunek przedstawia typowe bakterie kuliste, pałeczkowate i śrubowate, narysowane w jednej skali. Pokazana tu komórka śrubowata wywołuje kiłę

Bakterie są zasadniczo małe i rozmnażają się szybko przez podział na dwie komórki. W warunkach optymalnych przy pełnej dostępności substratów bakteria może dzielić się co 20 minut i w ciągu niecałych 11 godzin wytworzyć w ten sposób 5 miliardów komórek, co w przybliżeniu odpowiada liczbie ludzi na Ziemi. Z powodu dużej liczebności i szybkiego wzrostu populacje bakterii mogą szybko ewoluować, nabywając zdolność wykorzystywania nowych źródeł pokarmu lub odporność na nowe antybiotyki.

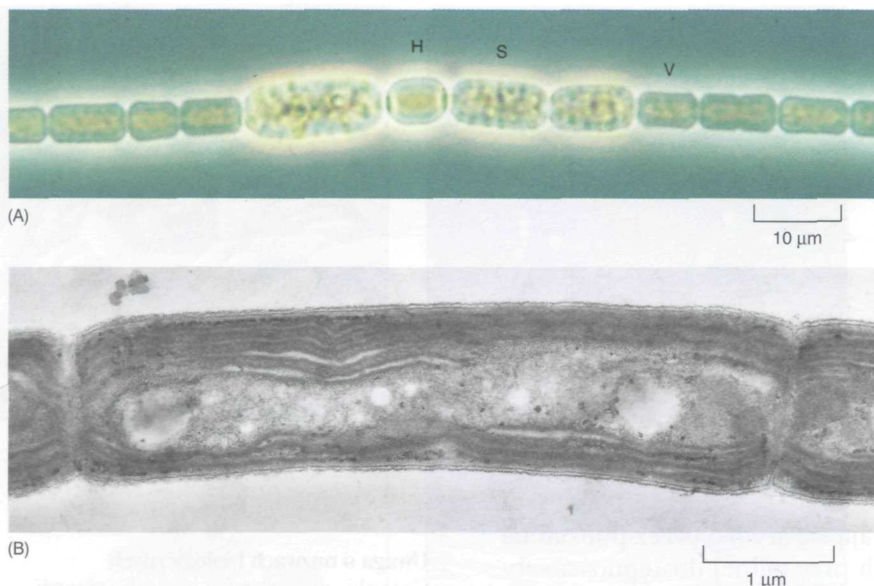
Pod względem kształtu i budowy bakterie mogą wydawać się proste, a ich możliwości ograniczone, jednak przeprowadzają procesy chemiczne najbardziej zróżnicowane i wymyślne ze wszystkich rodzajów komórek. Bakterie wykorzystują ogromną rozpiętość środowisk, od gorących kałuż w wulkanicznym mule do wnętrza innych żywych komórek, a ilościowo znacznie przewyższają wszystkie inne żywe organizmy. Niektóre żyją tlenowo, używając tlenu do utleniania substancji pokarmowych; inne żyją beztlenowo, unikając środowisk bogatych w tlen, który działa na nie zabójczo. Ponieważ uważa się, że mitochondria komórek eukariotycznych powstały przez ewolucję z bakterii tlenowych, które wniknęły do beztlenowej prakomórki eukariotycznej (patrz rys. 1-12), możemy uznać, że nasz tlenowy metabolizm opiera się właściwie na aktywności komórek bakteryjnych.

Zasadniczo każdy materiał organiczny, od drewna do ropy naftowej może służyć za pokarm jakiemuś rodzajowi bakterii. Co więcej, istnieją bakterie żyjące całkowicie na koszt związków nieorganicznych, zdobywające węgiel z CO_2 atmosferycznego, azot również z N_2 powietrza, a tlen, wodór, siarkę i fosfor — z powietrza, wody i minerałów. Pewne komórki bakteryjne, podobnie jak komórki roślinne, mając zdolność fotosyntezy zdobywają potrzebną do biosyntez energię ze światła słonecz-

Uwaga o nazwach biologicznych
Gatunki organizmów określa się oficjalnie dwoma wyrazami łacińskimi (zwykle drukowanymi kursywą), analogicznie do nazwiska i imienia osoby. Pierwsze słowo określa rodzaj (*Escherichia*), drugie — gatunek (*coli*). Rodzaj jest jednostką nadrzędną i przeważnie obejmuje więcej gatunków. Często skraca się nazwę rodzaju (*E. coli*) lub też opuszcza się nazwę gatunku (przez *Drosophila* rozumie się *Drosophila melanogaster*).



Rys. 1-25. Bakteria *Escherichia coli* (*E. coli*). Mikrografia elektronowa przekroju podłużnego. DNA komórki skupiony jest w obszarze o mniejszej gęstości elektronowej. (Dzięki uprzejmości: E. Kellenberger)



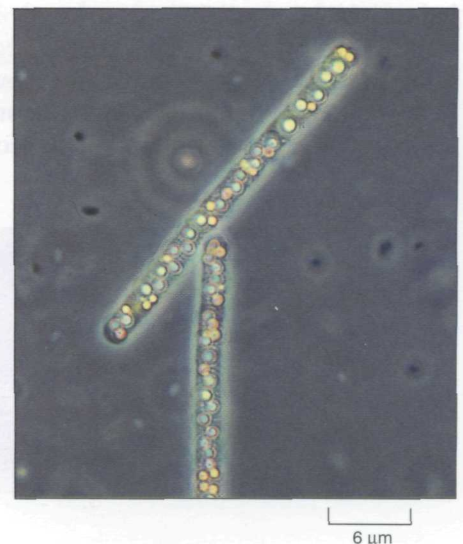
Rys. 1-26. Dwa typy bakterii fotosyntetyzujących. (A) Wygląd *Anabaena cylindrica* w mikroskopie świetlnym. Te prokariotyczne komórki tworzą długie wielokomórkowe nici, w których wyspecjalizowane komórki H wiążą azot (N_2) z atmosfery i wbudowują go w związki organiczne; komórki V prowadzą fotosyntezę i wiążą CO_2; komórki S stają się odpornymi sporami (zarodnikami). (B) Mikrografia elektronowa *Phormidium laminosum* z widocznymi błonami wewnątrzkomórkowymi, w których zachodzi fotosynteza. (Dzięki uprzejmości: A — Dave G. Adams, B — D.P. Hill, C.J. Howe)

nego (rys. 1-26); inne uzyskują energię chemiczną z substancji nieorganicznych otoczenia (rys. 1-27). W obu przypadkach takie bakterie odgrywają wyjątkową i podstawową rolę w ekonomii życia na Ziemi; inne organizmy są uzależnione od związków organicznych, wytwarzanych przez te bakterie z materiału nieorganicznego.

Rośliny stanowią częściowy wyjątek mogąc pochłaniać energię światła słonecznego i asymilować węgiel z atmosferycznego CO_2. Jednak rośliny nie mogą bez pomocy bakterii wykorzystać N_2 z atmosfery. W pewnym sensie rośliny potrzebują bakterii nawet do fotosyntezy; jak już wspomniano, jest prawie pewne, że chloroplasty — organelle komórki roślinnej zdolne do fotosyntezy — powstały ewolucyjnie z bakterii fotosyntetyzujących, które zadomowiły się w cytoplazmie komórki roślinnej (patrz rys. 1-14).

Tradycyjnie uważano, że wszystkie bakterie należą do tej samej dużej grupy. Jednak badania molekularne wykazały wyraźnie podział prokariota na dwa odrębne królestwa, nazwane *Eubacteria* i *Archaebacteria*. Na poziomie molekularnym królestwa te różnią się między sobą w równym stopniu jak każde z nich od *Eucaryota*. Większość bakterii znanych nam z codziennego życia — a więc żyjących w glebie oraz wywołujących choroby — jest eubakteriami. Archebakterie znajduje się zasadniczo w środowiskach wrogich innym typom komórek; niektóre gatunki żyją w wodzie silnie zasolonej, gorących kwaśnych źródłach wulkanicznych, w beztlenowych osadach zalegających głębiny morskie, w szlamie oczyszczalni ścieków oraz w kwaśnym beztlenowym wnętrzu żołądka krowy, gdzie rozkładają celulozę wytwarzając gaz, metan. Wiele z tych środowisk przypomina surowe warunki, które musiały istnieć pierwotnie na Ziemi, gdy powstawały pierwsze organizmy żywe, zanim w atmosferze pojawiło się dużo tlenu.

Pytanie 1-5. Bakteria waży około 10^{-12} g i może dzielić się co 20 minut. Jeśli pojedyncza bakteria mogłaby kontynuować podziały w takim tempie, ile czasu zabrałoby wytworzenie masy bakterii równającej się masie Ziemi ($6 \cdot 10^{24}$ kg)? Zestaw swój wynik z faktem, że bakterie powstały przynajmniej 3,5 miliarda lat temu i odtąd dzieliły się stale. Wyjaśnij pozorny paradoks. (Liczbę komórek N w hodowli w czasie t opisuje równanie $N = N_0 \cdot 2^{t/G}$, gdzie N_0 — liczba komórek w czasie zerowym, G — czas generacji, tj. pokolenia).



Rys. 1-27. Bakteria siarkowa. *Beggiatoa* żyjąca w środowisku siarkowym, zdobywa energię przez utlenianie H_2S i może wiązać CO_2 nawet w ciemności. W komórce widoczne żółte złogi siarki (Dzięki uprzejmości: Ralph W. Wolfe)

Biologowie molekularni skoncentrowali swą uwagę na *E. coli*

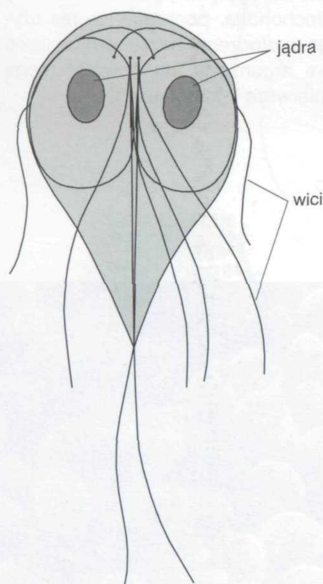
Z uwagi na dużą złożoność żywych organizmów, im więcej wiemy o danym gatunku, tym bardziej staje się on atrakcyjny jako obiekt badań; każde odkrycie budzi nowe pytania i pozwala w inny sposób podejść do rozwiązywania problemów dotyczących działania danego organizmu. Z tego powodu bardzo wielu biologów skoncentrowało się na badaniu tego samego organizmu. Spośród całego świata bakterii największe osiągnięcia biologii molekularnej dotyczyły głównie jednego gatunku, *Escherichia coli*, w skrócie *E. coli* (patrz rys. 1-25). Ta mała, pałeczkowata komórka eubakteryjna żyje normalnie w jelicie ludzi i innych kręgowców, ale można ją z łatwością hodować na prostej pożywce poza organizmem. *E. coli* radzi sobie dobrze z różnymi warunkami chemicznymi otoczenia i mnoży się bardzo szybko. Jej instrukcje genetyczne zawarte są w pojedynczej cząsteczce DNA; kierują one powstawaniem około 4000 różnych rodzajów białek. Dla porównania, komórka człowieka zawiera 600 razy więcej DNA, kodującego 50 000–100 000 rodzajów białek.

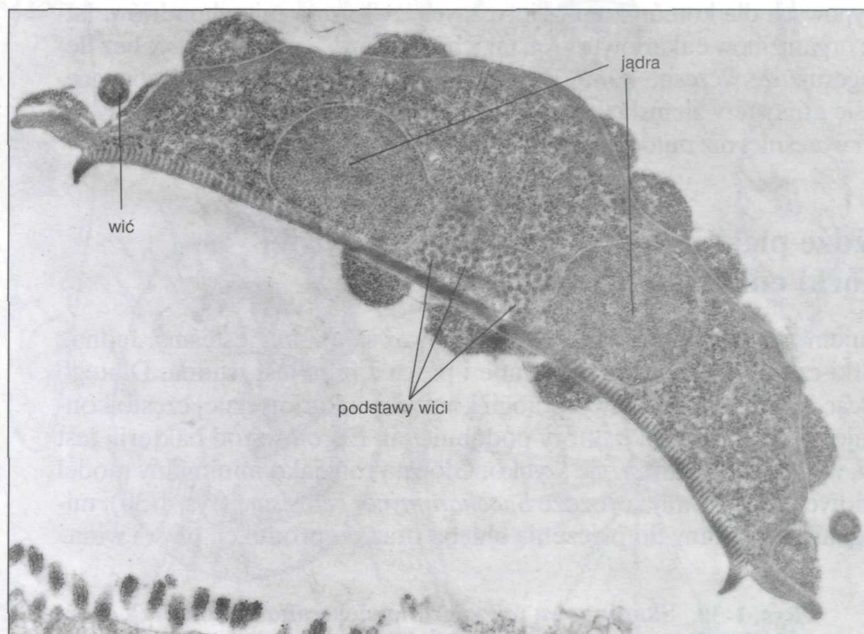
Pod względem molekularnym rozumiemy działanie *E. coli* o wiele lepiej aniżeli jakiegokolwiek innego organizmu. Właśnie z badań nad *E. coli* pochodzi większość naszej wiedzy o podstawowych mechanizmach życia, takich jak replikacja DNA czy odczytywanie instrukcji genetycznych. Dopiero późniejsze badania potwierdziły, że te podstawowe procesy przebiegają w naszych własnych komórkach zasadniczo w ten sam sposób jak u *E. coli.*

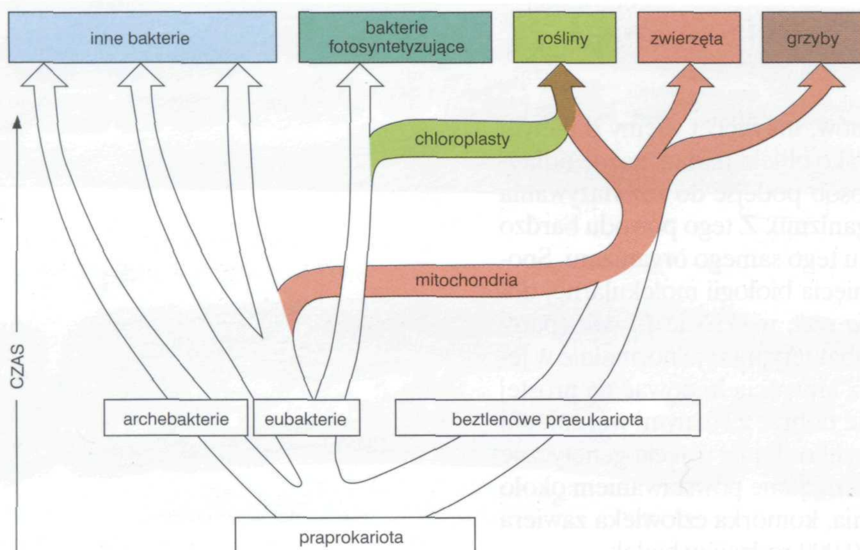
Giardia może stanowić pośredni etap w ewolucji komórek eukariotycznych

Z samej definicji komórek eukariotycznych, również tych, które budują nasze ciało, DNA znajduje się w oddzielnym przedziale — jądrze — osłoniętym podwójną błoną. Jak już widzieliśmy, komórki eukariotyczne mają

Rys. 1-28. ***Giardia*, jednokomórkowy mikroorganizm pasożytniczy.** (A) Rysunek organizmu widzianego w mikroskopie świetlnym. (B) Mikrografia elektronowa przekroju rozpłaszczonego ciała komórki. *Giardia* uważana jest za jeden z najbardziej prymitywnych typów komórek eukariotycznych. Ma jądro (w rzeczywistości nawet dwa, identyczne) i cytoszkielet, ale nie ma mitochondriów, chloroplastów, wykrywalnego retikulum endoplazmatycznego ani aparatu Golgiego. (A wg: G.D. Schmidt, L.S. Roberts, *Foundations of Parasitology*, 4th ed. St Louis: Times Mirror / Mosby, 1989; B — dzięki uprzejmości: Dennis Feely)







Rys. 1-29. Ewolucyjne pochodzenie obecnych eukariota. Linie rozwojowe eukariota, eubakterii i archebakterii uległy dywergencji już w bardzo wczesnym okresie ewolucji życia na Ziemi. Dopiero znacznie później komórki eukariotyczne wzbogaciły się w mitochondria, a jeszcze później pewna ich grupa wzbogaciła się w chloroplasty. Mitochondria są w zasadzie takie same u roślin, zwierząt i grzybów, dlatego uważa się, że pojawiły się w komórkach eukariotycznych przed dywergencją tych linii rodowodowych

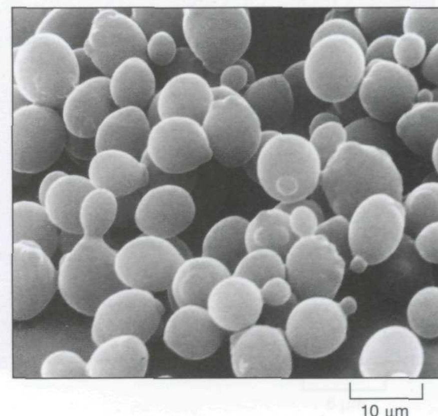
też liczne inne struktury, jak cytoszkielet, mitochondria i inne organelle, które odróżniają je od bakterii.

Eukariota (znane także jako *Eucarya*), eubakterie (*Bacteria*) i archebakterie (*Archaea*) musiały rozejść się bardzo wcześnie w historii życia na Ziemi (patrz: rozdz. 13). Nie może zdziwić, że eukariota nie nabyły wszystkich swoich cech charakterystycznych w tym samym czasie. Porównując współczesne gatunki eukariota miedzy sobą i z bakteriami, można wyciągnąć wnioski o istnieniu pewnych etapów w ewolucji eukariotów. Z tego punktu widzenia interesującym organizmem jest *Giardia*. Ten jednokomórkowy organizm o dziwnym wyglądzie (rys. 1-28) żyje beztlenowo w jelicie jako pasożyt i może wywoływać choroby u ludzi. Można go uznać za rodzaj żywej skamieliny, stanowiącej etap w połowie drogi ewolucji komórek eukariotycznych. Aczkolwiek obecność jądra (właściwie dwóch) i cytoszkieletu pozwala zaliczyć ją do eukariotów, analiza DNA wykazuje, że *Giardia* jest w równym stopniu zbliżona do bakterii, jak do pozostałych eukariotów, a poza tym brak jej innych organelli typowych dla komórek eukariotycznych, zwłaszcza mitochondriów. Istnienie organizmów eukariotycznych takich jak Giardia, mogących żyć bez tlenu, sugeruje, że wczesne komórki eukariotyczne powstały przed wzbogaceniem się atmosfery ziemskiej w tlen oraz że jądro i cytoszkielet pojawiły się w nich wcześniej niż mitochondria i chloroplasty (rys. 1-29).

Pytanie 1-6. *Giardia* ma jądro, ale nie ma mitochondriów i jest uważana za przystanek w połowie drogi ewolucji komórek eukariotycznych. Można jednak odwrócić to rozumowanie i wnioskować, że *Giardia* powstała z komórek eukariotycznych, które utraciły swoje mitochondria, ponieważ ich nie używały, żyjąc w otoczeniu beztlenowym. Jakie dodatkowe argumenty lub dowody mogą poprzeć pierwszą interpretację?

Drożdże piekarskie są przykładem prostej komórki eukariotycznej

Zajmujemy się głównie eukariotami, ponieważ sami nimi jesteśmy. Jednak komórki człowieka są skomplikowane i praca z nimi jest trudna. Dlatego też chcąc zrozumieć podstawy biologii komórki eukariotycznej często koncentrujemy się na gatunku, który podobnie jak *E. coli* wśród bakterii, jest prosty, wytrzymały i mnoży się szybko. Główną rolę jako minimalny model eukariotyczny odgrywają drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (rys. 1-30), mikroorganizm używany do pieczenia chleba oraz do produkcji piwa i wina.



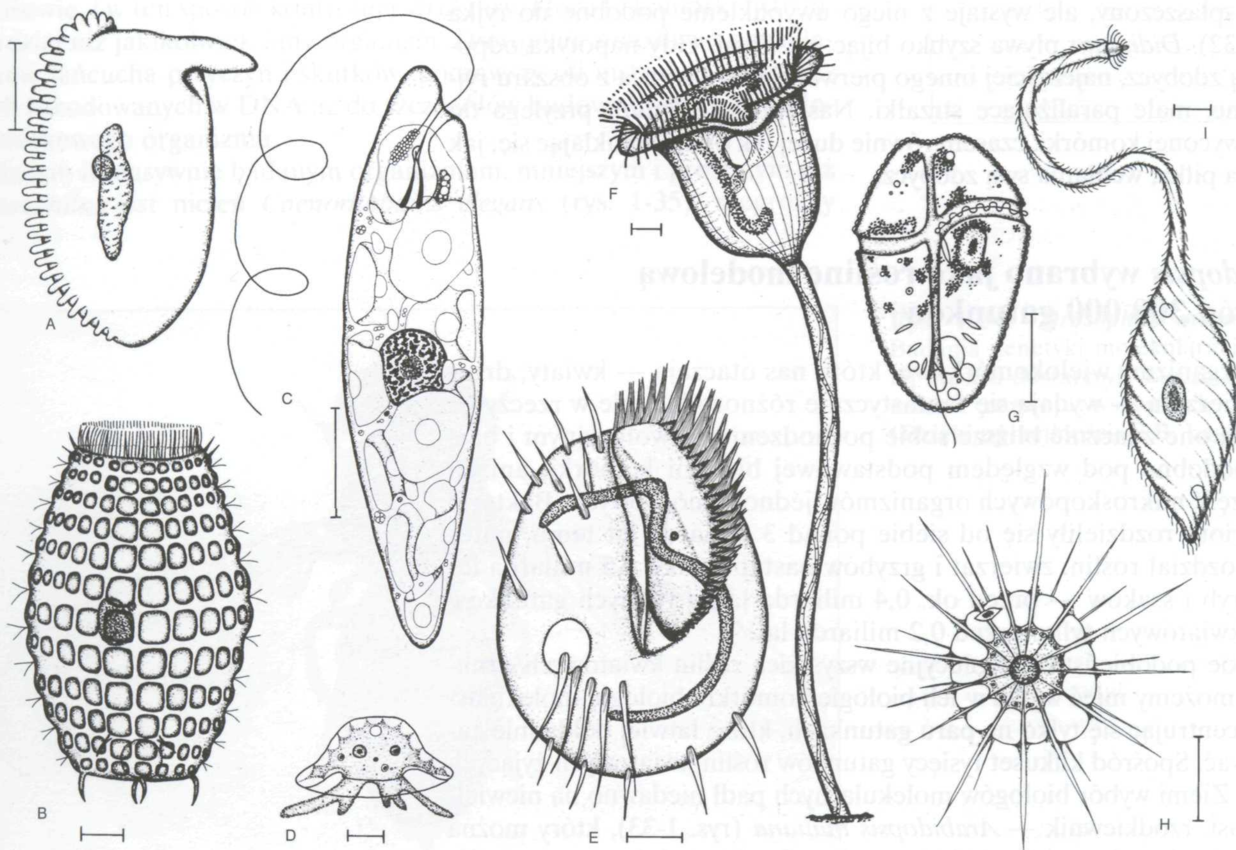
Rys. 1-30. Skaningowa mikrografia elektronowa komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Fotografię tego samego gatunku uzyskaną w mikroskopie świetlnym przedstawiono na rys. 1-7. (Dzięki uprzejmości: Ira Hereskowitz i Eric Schabatach)

S. cerevisiae jest małym, jednokomórkowym grzybem, a więc według obecnych poglądów jest tak samo blisko spokrewniony ze zwierzętami i roślinami. Podobnie jak inne grzyby ma sztywną ścianę komórkową, jest mało ruchliwy i zawiera mitochondria, ale nie ma chloroplastów. Na pełnowartościowej pożywce mnoży się prawie tak szybko jak bakterie. Ponieważ jądro komórkowe drożdży zawiera tylko 2,5 razy więcej DNA niż komórki *E. coli*, drożdże są także dobrym obiektem do analizy genetycznej. Genetyczne i biochemiczne badania nad drożdżami miały zasadnicze znaczenie dla zrozumienia wielu podstawowych mechanizmów działających w komórkach eukariotycznych, włącznie z cyklem podziałów komórkowych, a więc łańcuchem procesów, dzięki którym jądro i wszystkie inne składniki komórki zostają podwojone i rozdzielone do dwóch powstających komórek potomnych.

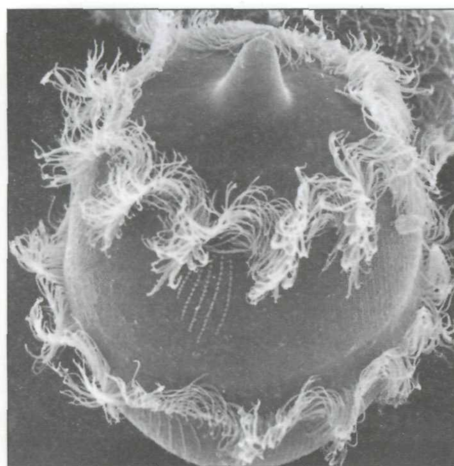
Pytanie 1-7. Twój najbliższy sąsiad ofiarował 100 złotych na poparcie badań nad rakiem i przeraziła go wiadomość, że jego pieniądze używane są do doświadczeń z drożdżami. Jak mógłbyś go uspokoić?

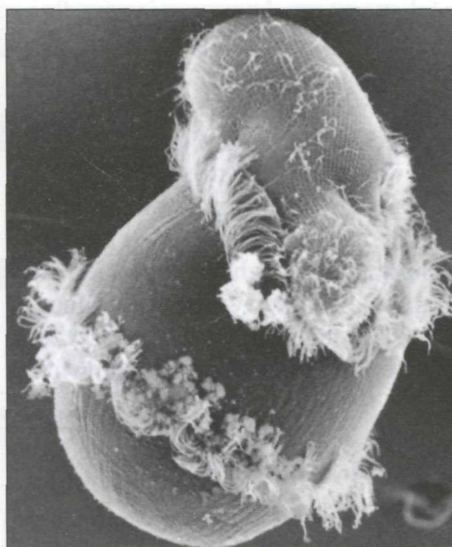
Organizmy jednokomórkowe mogą być duże, złożone i agresywne: pierwotniaki

Drożdże są małymi, prostymi i nieszkodliwymi komórkami, które karmią się cukrem, wydzielają alkohol i dwutlenek węgla. Istnieje jednak wielka rozmaitość innych wolno żyjących jednokomórkowych eukariotów o bardzo różnych cechach. Do grupy jednokomórkowych organizmów określanych jako **pierwotniaki** należą i takie, które są najbardziej złożone i agresywne spośród znanych komórek. Tak jak różne są formy pierwotniaków zebranych przykładowo na rys. 1-31, różni się i ich zachowanie: mogą one być ruchliwe lub osiadłe, mięsożerne lub zdolne do fotosyntezy. Ich



Rys. 1-31. Zbiór pierwotniaków ilustrujący niezwykłą różnorodność w obrębie tej klasy jednokomórkowych mikroorganizmów. Rysunki wykonano w różnej skali, ale na każdym z nich pokazany odcinek wynosi 10 µm. Organizmy A, B, E, F, I — orzęski; C — euglena, D — ameba, G — bruzdnica, H — słonecznica. (Z: M.A. Sleigh, *The Biology of Protozoa*. London: Edward Arnold, 1973)





Rys. 1-32. Jeden pierwotniak zjadający drugiego. Mikrografia po lewej pokazuje samą komórkę *Didinium,* opasujące ją pierścienie rzęsek i jej „ryjek" (u góry). Na obrazie po prawej stronie uchwycono moment wchłaniania innego orzęska, *Paramecium.* (Dzięki uprzejmości: D. Barlow)

anatomia jest często bardzo skomplikowana i obejmuje takie struktury jak wyrostki czuciowe, fotoreceptory, ruchome rzęski, wypustki w kształcie trzonka, aparaty gębowe, wyrzucane kłujące strzałki i wiązki kurczliwe podobne do mięśni. Będąc pojedynczymi komórkami, pierwotniaki mogą być tak skomplikowane i wielostronne jak organizmy wielokomórkowe, czego przykładem jest *Didinium*.

Didinium jest dużym, mięsożernym pierwotniakiem o średnicy około 150 µm, a więc około dziesięć razy większym niż przeciętna komórka człowieka. Ma ciało kuliste, owinięte dwoma pasmami rzęsek; przód komórki jest spłaszczony, ale wystaje z niego uwypuklenie podobne do ryjka (rys. 1-32). *Didinium* pływa szybko bijąc rzęskami. Gdy napotyka odpowiednią zdobycz, najczęściej innego pierwotniaka, wyrzuca z obszaru ryjka liczne, małe paraliżujące strzałki. Następnie *Didinium* przylega do przechwyconej komórki, czasem równie dużej jak ono, i wpuklając się, jak przebita piłka, wchłania swą zdobycz.

Arabidopsis wybrano jako roślinę modelową spośród 300 000 gatunków

Duże organizmy wielokomórkowe, które nas otaczają — kwiaty, drzewa i zwierzęta — wydają się fantastycznie różnorodne, ale w rzeczywistości są one znacznie bliższe sobie pochodzeniem ewolucyjnym i bardziej podobne pod względem podstawowej biologii komórki, aniżeli duża część mikroskopowych organizmów jednokomórkowych. Bakterie i eukariota rozdzieliły się od siebie ponad 3 miliardy lat temu, natomiast rozdział roślin, zwierząt i grzybów nastąpił tylko 1,5 miliarda lat temu, ryb i ssaków — przed ok. 0,4 miliarda lat, a różnych gatunków roślin kwiatowych tylko przed 0,2 miliarda lat.

Bliskie podobieństwo ewolucyjne wszystkich roślin kwiatowych oznacza, że możemy mieć wgląd w ich biologię komórki i biologię molekularną koncentrując się tylko na paru gatunkach, które łatwiej dokładnie zanalizować. Spośród kilkuset tysięcy gatunków roślin kwiatowych żyjących dziś na Ziemi wybór biologów molekularnych padł niedawno na niewielki chwast, rzodkiewnik — *Arabidopsis thaliana* (rys. 1-33), który można masowo hodować w szklarni i który w ciągu 8–10 tygodni wytwarza tysiące roślin potomnych. *Arabidopsis* ma w każdej komórce tylko 3–4 razy



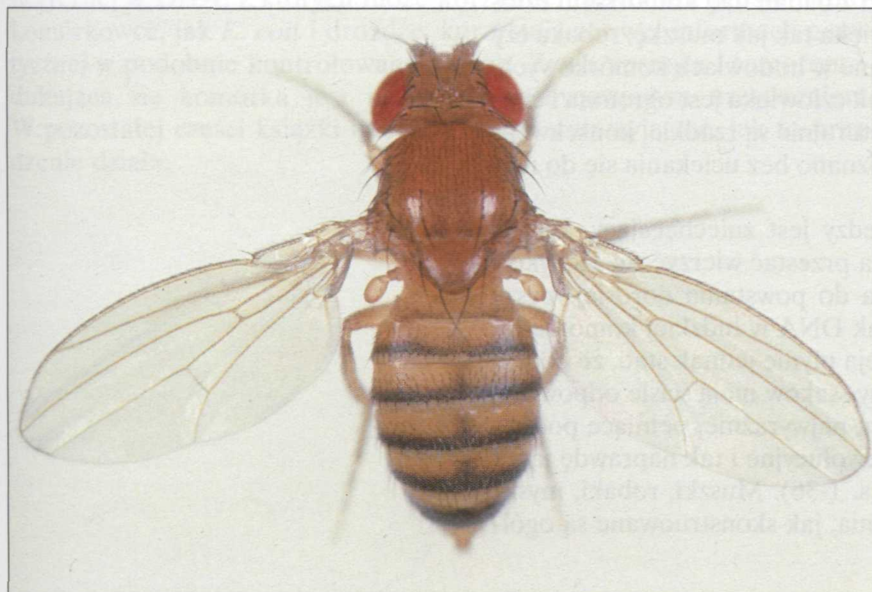
Rys. 1-33. ***Arabidopsis thaliana*** **— rzodkiewnik pospolity.** Ten mały chwast jest ulubionym obiektem badań w zakresie biologii molekularnej i rozwoju roślin. (Dzięki uprzejmości: Toni Hayden i John Innes Centre)

więcej DNA niż drożdże i zaczynamy już rozumieć, jak zawarte w tym DNA instrukcje genetyczne umożliwiają współpracę jego komórek w formowaniu typowej rośliny kwiatowej.

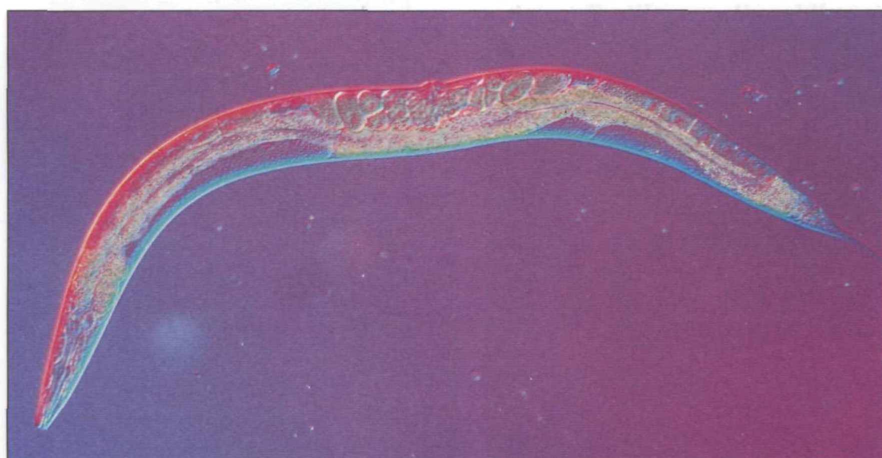
Świat zwierząt reprezentują muszka, nicień, mysz i *Homo sapiens*

Spośród zwierząt wielokomórkowych większość gatunków stanowią owady. Nic więc dziwnego, że mała muszka owocowa — *Drosophila melanogaster* (rys. 1-34), zajmuje centralne miejsce w badaniach biologicznych. Celem skoncentrowanego ataku stała się genetyka *Drosophila*, a zwłaszcza mechanizmy genetyczne leżące u podstaw jej rozwoju embrionalnego i larwalnego. Dzięki pracy nad *Drosophila* zaczynamy już szczegółowo rozumieć, jak żywe komórki realizują swoje najbardziej spektakularne osiągnięcie, a mianowicie jak pojedyncza zapłodniona komórka jajowa (*zygota*) rozwija się w wielokomórkowy organizm obejmujący ogromną ilość komórek różnych typów, zorganizowanych w dokładnie przewidywalny sposób. Wzór budowy dorosłego owada, z jego ciałem i głową, nogami, skrzydłami i oczami, jest zdeterminowany przez zawarte w zygocie geny, które zostają skopiowane i przekazane do każdej komórki ciała. Geny te określają, jak każda komórka będzie zachowywać się w stosunku do komórek siostrzanych i tych o dalszym pokrewieństwie, i w ten sposób kontrolują struktury, które te komórki tworzą. Bardziej niż jakikolwiek inny organizm, *Drosophila* umożliwia nam śledzenie łańcucha przyczyn i skutków, począwszy od instrukcji genetycznych zakodowanych w DNA aż do szczegółów budowy dorosłego wielokomórkowego organizmu.

Innym intensywnie badanym organizmem, mniejszym i prostszym niż *Drosophila*, jest nicień *Caenorhabditis elegans* (rys. 1-35), niegroźny



Rys. 1-34. ***Drosophila melanogaster.*** Badania genetyki molekularnej tej małej muszki dostarczyły klucza do zrozumienia rozwoju wszystkich zwierząt. (Dzięki uprzejmości: E.B. Lewis)



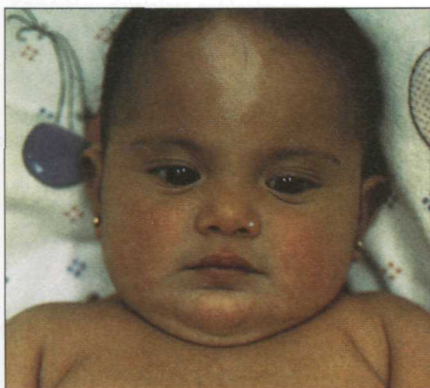
Rys. 1-35. ***Caenorhabditis elegans.*** Ten mały nicień żyje w glebie. Niezwykle szczegółowo prześledzono jego rozwój od zapłodnionej komórki jajowej do 959 komórek składających się na dorosły organizm i zebrano wiele wiadomości o mechanizmach genetycznych rządzących tym rozwojem. Większość osobników jest hermafrodytami, wytwarzającymi zarówno jaja, jak i plemniki. (Dzięki uprzejmości: Ian Hope)

krewniak nicieni atakujących uprawy. Rozwój tego zwierzęcia przebiega z zegarmistrzowską precyzją od zapłodnionej komórki jajowej do postaci dojrzałej, która liczy dokładnie 959 komórek (plus zmienna ilość komórek jajowych i plemnikowych). Dysponujemy już szczegółowym opisem składającej się na to sekwencji wydarzeń, a mianowicie jak komórki dzielą się, poruszają i specjalizują według ścisłych i przewidywalnych reguł.

Na drugim biegunie znajdują się ssaki, należące do najbardziej złożonych organizmów zwierzęcych, mające 10 razy więcej genów i — w swej postaci dorosłej — miliony razy więcej komórek niż *Drosophila*. Jako modelowego organizmu do badań genetyki, rozwoju, immunologii i biologii komórki ssaków od dawna używano myszy. Nowe techniki przydały tym badaniom jeszcze większego znaczenia. Możemy obecnie hodować linie myszy o dowolnie skonstruowanych mutacjach jakiegokolwiek specyficznego genu lub linie z wprowadzonymi sztucznie skonstruowanymi genami. W ten sposób można sprawdzać, który gen jest dla danego procesu istotny i jak funkcjonuje.

Na końcu tej listy organizmów modelowych znajduje się sam człowiek. Bodźcem do badań biologii komórki jest w dużym stopniu aspekt medyczny i znaczna część naszej wiedzy pochodzi z badań nad komórkami człowieka. Oczywiście nie można badać człowieka tak jak muszkę, robaka czy mysz, ale komórki ludzkie mogą być badane w hodowlach komórkowych. Medyczna baza danych dotycząca komórek człowieka jest ogromna i chociaż mutacje danego genu występujące naturalnie są rzadkie, konsekwencje mutacji w tysiącach różnych genów poznano bez uciekania się do metod inżynierii genetycznej.

Niemniej jednak zakres naszej niewiedzy jest zniechęcający. Biorąc pod uwagę złożoność ciała ssaków, można przestać wierzyć, że kiedykolwiek zrozumiemy, jak DNA doprowadza do powstania dorosłej myszy z zapłodnionej komórki jajowej czy też jak DNA w ludzkiej komórce jajowej kieruje rozwojem człowieka. Nadzieja płynie jednak stąd, że odkrycia biologii molekularnej pokazały, iż geny ssaków mają ścisłe odpowiedniki u *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila*, najwyraźniej pełniące podobne funkcje. Mamy wspólne pochodzenie ewolucyjne i tak naprawdę łączy nas ten sam mechanizm molekularny (rys. 1-36). Muszki, robaki, myszy i ludzie stanowią więc klucz do zrozumienia, jak skonstruowane są ogólnie zwierzęta.





Rys. 1-36. **Różne gatunki łączy identyczność mechanizmów molekularnych.** Pokazane niemowlę i mysz mają białe łatki na czole, ponieważ u obu wystąpił defekt w tym samym genie (o nazwie *kit*), niezbędnym do powstania i utrzymywania się komórek barwnikowych. (Dzięki uprzejmości: R.A. Fleischman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88*: 10885–10889, 1991. © 1991 National Academy of Science)

W wielokomórkowym organizmie komórki mogą być spektakularnie różne

Komórki poszczególnego zwierzęcia czy rośliny są niezwykle zróżnicowane (panel 5-1, s. 32–33). Komórki tkanki tłuszczowej, kostnej, skóry i komórki nerwowe są tak do siebie niepodobne, jak tylko różne mogą być komórki, a jednak wszystkie te *typy zróżnicowanych komórek* powstają w rozwoju embrionalnym z pojedynczej zapłodnionej komórki jajowej i wszystkie zawierają identyczne kopie DNA danego gatunku. Inaczej mówiąc, komórki oglądane pod określonym kątem są zaskakująco różne, a pod innym kątem — zaskakująco takie same. Wyjaśnienie polega na sposobie wykorzystywania identycznej instrukcji genetycznej przez indywidualne komórki wielokomórkowego organizmu. Różne komórki dopuszczają ekspresję różnych genów zależnie od sygnałów, które zarówno one same, jak i komórki, z których powstały, odbierają ze swego otoczenia.

Zobaczymy później, że DNA nie jest tylko „listą zakupów", wyszczególniającą cząsteczki, które każda komórka musi mieć, a z kolei komórki nie są tylko zestawem wszystkich pozycji z tej listy. Przeciwnie, każda komórka zachowuje się jak wieloczynnościowa maszyna mająca czujniki do odbioru sygnałów z otoczenia, wbudowany komputer kontrolujący zakres możliwych czynności i wiele megabajtów informacji genetycznej w DNA, z których może korzystać. Nawet tak proste jednokomórkowce, jak *E. coli* i drożdże, korzystają ze swej informacji genetycznej w podobnie kontrolowany sposób. Żywa, rosnąca i samoreprodukująca się komórka jest naprawdę zachwycającym urządzeniem. W pozostałej części książki będziemy się starali wyjaśnić, jak to urządzenie działa.

TYPY KOMÓREK

W ciele człowieka istnieje ponad dwieście typów komórek. Wchodzą one w skład różnego rodzaju tkanek, takich jak:

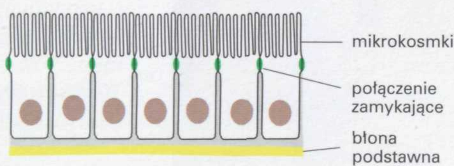
- nabłonek
- tkanka łączna
- tkanka mięśniowa
- tkanka nerwowa

Większość tkanek jest zbiorem różnych typów komórek

NABŁONKI

Komórki nabłonkowe tworzą zwarte warstwy komórek zwane nabłonkami, które wyściełają wewnętrzne i pokrywają zewnętrzne powierzchnie ciała. Istnieje wiele wyspecjalizowanych typów nabłonków

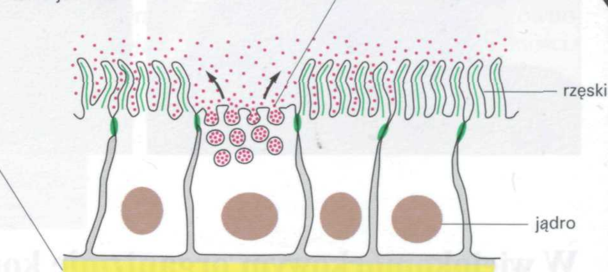
Komórki chłonne mają na wolnej powierzchni liczne włosowate wypustki – mikrokosmki, które zwiększają powierzchnię absorpcyjną.



Między przylegającymi komórkami nabłonkowymi są połączenia zamykające, które nadają całej warstwie odporność mechaniczną i czynią ją nieprzepuszczalną nawet dla małych cząsteczek. Warstawa komórek nabłonkowych spoczywa na błonie podstawnej

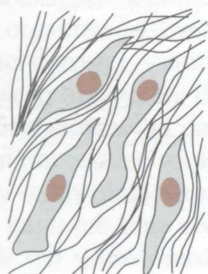
Komórki rzęskowe mają na wolnej powierzchni rzęski, których synchroniczny ruch przesuwa ponad warstwą nabłonka substancje takie jak śluz

Komórki wydzielnicze występują w większości nabłonków warstwowych. Te wyspecjalizowane komórki wydzielają substancje na powierzchnię warstwy komórek



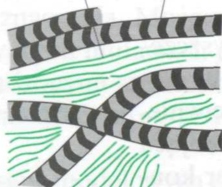
TKANKA ŁĄCZNA

Przestrzenie pomiędzy organami i tkankami ciała są wypełnione tkanką łączną zbudowaną zasadniczo jako sieć sztywnych włókien białkowych zanurzonych w polisacharydowym żelu. Ta substancja międzykomórkowa jest wydzielana głównie przez fibroblasty w luźnej tkance łącznej

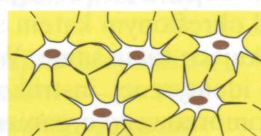


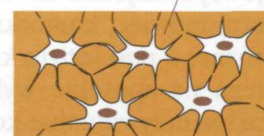
fibroblasty w luźnej tkance łącznej

Dwoma głównymi typami białkowych włókien międzykomórkowych są kolagen i elastyna

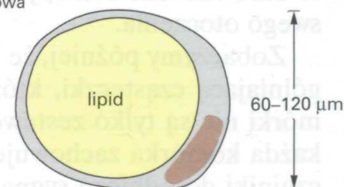


Kość zbudowana jest z komórek o nazwie osteoblasty. Komórki te wydzielają substancję międzykomórkową, w której są odkładane później kryształy fosforanu wapnia

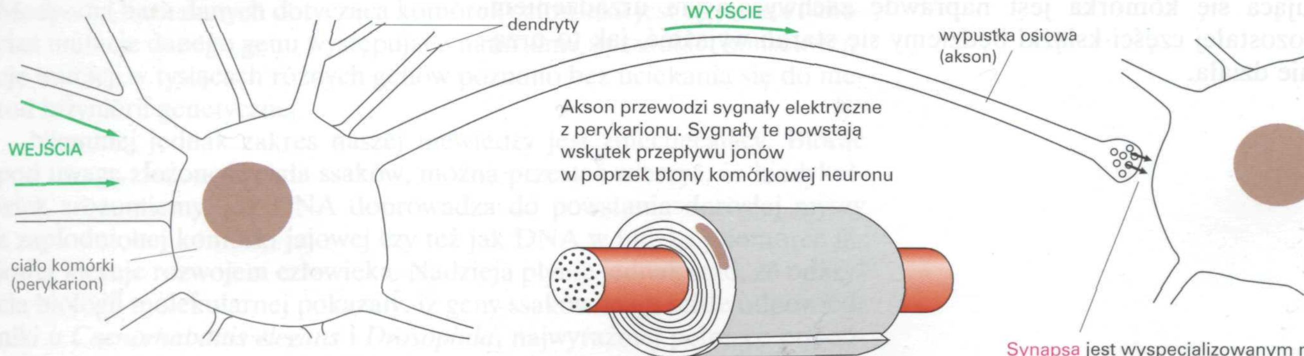




Komórki tłuszczowe, jedne z największych komórek ciała, są odpowiedzialne za wytwarzanie i magazynowanie tłuszczu. Jądro i cytoplazma są spłaszczone przez dużą kroplę tłuszczu



TKANKA NERWOWA



Akson przewodzi sygnały elektryczne z perykarionu. Sygnały te powstają wskutek przepływu jonów w poprzek błony komórkowej neuronu

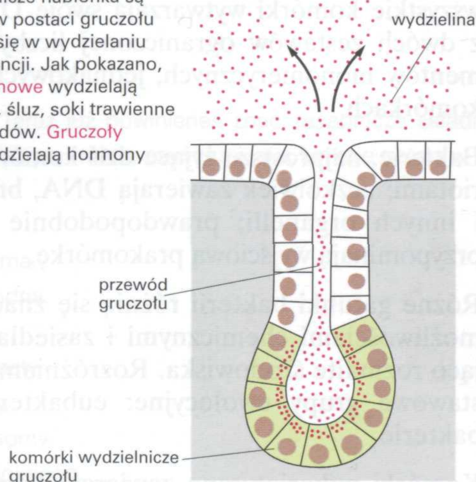
Komórki nerwowe, czyli neurony są wyspecjalizowane w przesyłaniu informacji. Na przykład mózg i rdzeń kręgowy są zbudowane z sieci neuronów przebiegającej wśród komórek glejowych o funkcji pomocniczej

Wyspecjalizowane komórki glejowe owijają się wokół aksonu, tworząc z wielu warstw błony osłonkę mielinową

Synapsa jest wyspecjalizowanym miejscem złączenia, w którym jeden neuron łączy się z drugim neuronem (lub z komórką mięśniową). Synapsy są miejscem lokalnego przekazywania informacji między tymi komórkami

Panel 1-3. Typy zróżnicowanych komórek ssaków

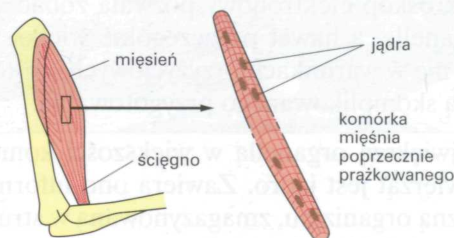
Komórki wydzielnicze nabłonka są często skupione w postaci gruczołu specjalizującego się w wydzielaniu określonej substancji. Jak pokazano, gruczoły egzokrynowe wydzielają swój produkt (łzy, śluz, soki trawienne i inne) do przewodów. Gruczoły endokrynowe wydzielają hormony do krwi



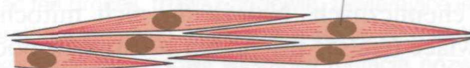
MIĘSIEŃ

Komórki mięśniowe kurcząc się wytwarzają siłę mechaniczną. U kręgowców występują ich trzy główne typy:

mięsień szkieletowy (poprzecznie prążkowany) – przez szybki i silny skurcz porusza stawami. Mięsień jest wiązką włókien mięśniowych, z których każde jest ogromną, wielojądrową komórką



mięsień gładki – występuje w przewodzie pokarmowym, pęcherzu, tętnicach i żyłach. Nie wykazuje prążkowania, jest zbudowany z cienkich, wydłużonych komórek, z których każda ma jedno jądro



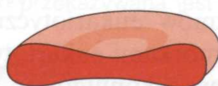
mięsień sercowy – ma cechy pośrednie między mięśniem szkieletowym a gładkim. Jest odpowiedzialny za skurcze serca. Przylegające do siebie komórki są powiązane połączeniami przewodzącymi bodźce elektryczne, powodujące synchronizację skurczu komórek

KREW

Erytrocyty (krwinki czerwone) są bardzo małymi komórkami, które u ssaków nie mają jądra ani wewnętrznych błon. Gdy dojrzewają, wypełniają się hemoglobiną, białkiem wiążącym tlen



1 cm³ krwi zawiera 5 miliardów erytrocytów

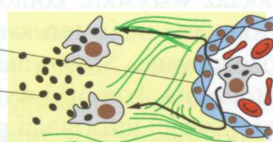


erytrocyt ma kształt dwuwklęsłego dysku

Leukocyty (krwinki białe) ochraniają przed infekcją. Krew zawiera średnio jeden leukocyt na każde sto erytrocytów. Aczkolwiek leukocyty wędrują w krwiobiegu, mogą też przenikać przez ściany naczyń krwionośnych i działać w otaczających tkankach. Jest ich kilka różnych rodzajów, w tym:

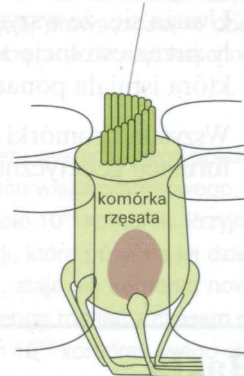
limfocyty – czynne w odpowiedzi immunologicznej przez wytwarzanie przeciwciał

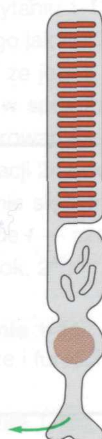
makrofagi i neutrofile – przemieszczają się do miejsca infekcji, gdzie wchłaniają bakterie i szczątki



KOMÓRKI CZUCIOWE

Do najbardziej uderzająco wyspecjalizowanych komórek ciała kręgowców należą te, które odbierają bodźce zewnętrzne. Komórki rzęsate ucha wewnętrznego są pierwszymi detektorami dźwięku. Są to zmodyfikowane komórki nabłonkowe, mające na powierzchni specjalne mikrokosmki – stereocilia. Ruch tych kosmków powodowany przez fale dźwiękowe wywołuje sygnał elektryczny przekazywany do mózgu

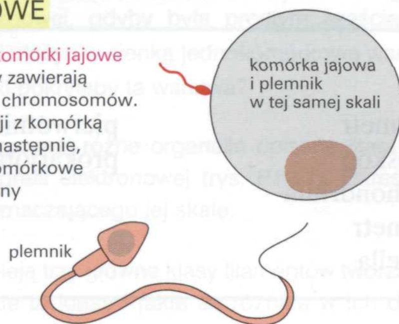




Komórki pręcikowe siatkówki oka są wyspecjalizowane w odpowiedzi na światło. Ich światłoczuły region zawiera wiele spłaszczonych pęcherzyków błonowych – dysków (kolor *czerwony*). W błonach tych znajduje się barwnik wrażliwy na światło – rodopsyna. Światło wywołuje sygnał elektryczny (*zielona strzałka*) przekazywany do komórek nerwowych oka, które przewodzą sygnał dalej do mózgu

KOMÓRKI PŁCIOWE

Zarówno plemniki, jak i komórki jajowe są haploidalne, to znaczy zawierają tylko pojedynczy zestaw chromosomów. Plemnik samca ulega fuzji z komórką jajową samicy, tworząc następnie, przez kolejne podziały komórkowe nowy organizm diploidalny



Streszczenie

- Komórka jest podstawową jednostką życia.
- Komórki tkanek i roślin mają zazwyczaj 5–20 μm średnicy; są widoczne w mikroskopie świetlnym, który ujawnia również pewne ich składniki wewnętrzne, w tym organelle.
- Mikroskop elektronowy pozwala zobaczyć mniejsze organelle, a nawet poszczególne wielkie cząsteczki, ale nie w warunkach przyżyciowych, a próbki wymagają skomplikowanego przygotowania.
- Największą organellą w większości komórek roślin i zwierząt jest jądro. Zawiera ono informację genetyczną organizmu, zmagazynowaną w strukturze cząsteczek DNA. Pozostała — poza jądrem — reszta komórki stanowi cytoplazmę.
- Cytoplazma komórek zwierząt i roślin zawiera różne inne otoczone błoną organelle o specjalnych funkcjach chemicznych. Należą do nich mitochondria, stanowiące miejsce utleniania substratów pochodzących z pokarmu oraz — w komórkach roślin — chloroplasty, dokonujące fotosyntezy.
- Pozostałym, po wykluczeniu obłonionych organelli, przedziałem wewnątrzkomórkowym jest cytozol. Zawiera on zagęszczoną mieszaninę dużych i małych cząsteczek uczestniczących w wielu istotnych procesach biochemicznych.
- Poprzez cały cytozol rozciąga się system włókien białkowych (filamentów) nazywany cytoszkieletem. Warunkuje on kształt i ruchy komórki oraz umożliwa przemieszczanie organelli i cząsteczek z jednego miejsca w cytoplazmie w drugie.
- Uważa się, że wszystkie dziś żyjące komórki powstały przez ewolucję tej samej prakomórki wyjściowej, która istniała ponad 3 miliardy lat temu.
- Wszystkie komórki zawierają DNA jako magazyn informacji genetycznej i używają go do syntezy białek; wszystkie komórki wytwarzają swoje DNA i białka z dwóch zestawów ograniczonej liczby typów elementów monomerycznych, jednakowych w różnych komórkach.
- Bakterie, najprostsze żyjące dziś komórki są prokariotami; aczkolwiek zawierają DNA, brak im jądra i innych organelli; prawdopodobnie najbardziej przypominają wyjściową prakomórkę.
- Różne gatunki bakterii różnią się znacznie swymi możliwościami chemicznymi i zasiedlają zaskakująco rozmaite środowiska. Rozróżniamy dwie podstawowe grupy ewolucyjne: eubakterie i archebakterie.
- Komórki eukariotyczne zawierają jądro. Powstały one prawdopodobnie ewolucyjnie poprzez serię stadiów, począwszy od komórek bardziej zbliżonych do bakterii. Ważnym etapem było wzbogacenie się o mitochondria przez wchłonięcie bakterii, żyjących odtąd w symbiozie z większymi komórkami beztlenowymi.
- Niektóre z wolno żyjących jednokomórkowych organizmów eukariotycznych są najbardziej złożonymi komórkami eukariotycznymi, jakie znamy, i potrafią pływać, koniugować, polować i pożerać pożywienie.
- Inne typy komórek eukariotycznych współpracują ze sobą i wytwarzają duże, skomplikowane organizmy wielokomórkowe, takie jak my sami, złożone z tysięcy miliardów komórek
- Biologowie wybrali niewielką ilość organizmów, na których zogniskowali swoje badania. Są to m.in. bakteria *E. coli*, drożdże piekarskie, pewien nicień, muszka owocowa, mała roślina — rzodkiewnik, mysz i sam człowiek.
- Chociaż wszystkie komórki w organizmie wielokomórkowym mają ten sam DNA, mogą być bardzo zróżnicowane. Stosownie do sygnałów odbieranych z otoczenia, komórki wykorzystują wybiórczo różne części swojej informacji genetycznej.

Hasła

bakteria	cytozol	mikrometr	pierwotniak
chloroplast	eukariota	mikroskop	prokariota
chromosom	ewolucja	mitochondrium	
cytoplazma	jądro	nanometr	
cytoszkielet	komórka	organella	

Pytania

Pytanie 1-8. Teraz już powinieneś znać zasadnicze składniki komórki. Opisz po krótce, czym są i jaką funkcję pełnią w komórce:

A. Cytozol.
B. Cytoplazma.
C. Mitochondria.
D. Jądro.
E. Chloroplasty.
F. Lizosomy.
G. Chromosomy.
H. Aparat Golgiego.
I. Peroksysomy.
J. Błona komórkowa.
K. Retikulum endoplazmatyczne.
L. Cytoszkielet.

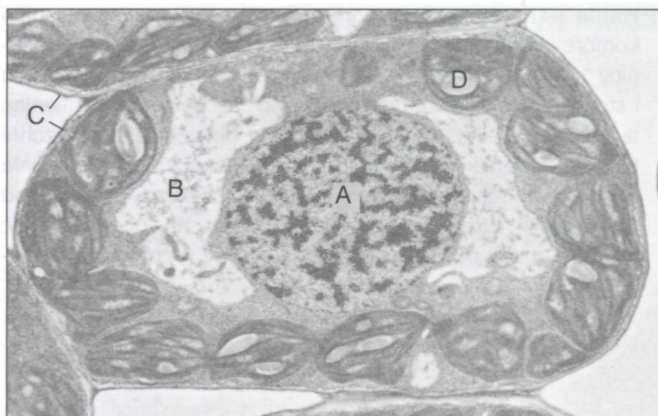
Pytanie 1-9. Które z następujących zdań są prawdziwe? Uzasadnij swoją odpowiedź.

A. Informacja dziedziczna komórki przekazywana jest przez jej białka.
B. Bakteryjny DNA występuje w cytozolu.
C. Rośliny zbudowane są z komórek prokariotycznych.
D. Wszystkie komórki danego organizmu mają tę samą liczbę chromosomów (z wyjątkiem komórek jajowych i plemników).
E. Cytozol zawiera obłonione organelle, takie jak lizosomy.
F. Jądro i mitochondria otoczone są podwójną błoną.
G. Pierwotniaki są złożonymi organizmami, w których zestaw wyspecjalizowanych komórek tworzy tkanki takie jak wici, aparaty gębowe, trujące strzałki i nóżkowate wypustki.
H. Lizosomy i peroksysomy są miejscem degradacji niepożądanych materiałów.

Pytanie 1-10. Aby wczuć się w wielkość komórek (a zarazem wyćwiczyć system metryczny) rozważ następujący układ: mózg ludzki waży około 1 kilograma i zawiera około 10^{11} komórek. Oblicz przeciętną objętość komórki mózgu (chociaż wiemy, że ich wielkości bardzo się różnią) przyjmując, że każda komórka jest całkowicie wypełniona wodą (1 ml wody waży 1 g). Jaka byłaby długość jednej krawędzi takiej uśrednionej komórki mózgowej, gdyby była prostym sześcianem? Gdyby te komórki ułożyć w cienką jednokomórkową warstwę, ile stron tej książki pokryłaby ta warstwa?

Pytanie 1-11. Rozpoznaj różne organelle opisane literami na załączonej mikrografii elektronowej (rys. P1-11). Określ długość odcinka wyznaczającego jej skalę.

Pytanie 1-12. Istnieją trzy główne klasy filamentów tworzących cytoszkielet. Jakie to klasy i jakie są różnice w ich działaniu?



Rys. P1-11

Pytanie 1-13. Dobór naturalny jest w ewolucji ogromną siłą, ponieważ komórki o nawet niewielkiej przewadze intensywności wzrostu szybko przerosną swoich konkurentów. Aby zilustrować ten proces, rozważ hodowlę, zawierającą jeden milion komórek bakteryjnych, które dzielą się co 20 min. W pojedynczej komórce tej hodowli wystąpiła mutacja pozwalająca jej dzielić się szybciej, z czasem generacji (pokolenia) tylko 15 min; zakładamy nieograniczoną dostępność pokarmu i nieśmiertelność komórek. Zastanów się, ile czasu potrzeba, aby potomstwo tej zmutowanej komórki przeważyło w hodowli? (Zanim przystąpisz do obliczeń, spróbuj zgadnąć, czy zajmie to około dnia, tygodnia, miesiąca czy roku?) Ile komórek każdego z tych dwóch rodzajów znajdzie się w tym czasie w hodowli? (Liczbę komórek N w hodowli w czasie t opisuje równanie $N = N_0 \cdot 2^{t/G}$, gdzie N_0 — liczba komórek w czasie zerowym, G — czas generacji).

Pytanie 1-14. Gdy bakterie rosną w warunkach niekorzystnych, np. w obecności „trucizny" jaką jest antybiotyk, większość komórek rośnie wolniej niż normalnie. Jednak często szybkość wzrostu hodowli bakteryjnej prowadzonej w obecności antybiotyku po paru dniach powraca do szybkości normalnej. Wytłumacz, jak się to dzieje.

Pytanie 1-15. Zastosuj zasadę wzrostu wykładniczego opisaną w pytaniu 1-13 do komórek organizmu wielokomórkowego, takiego jak twój. W twoim ciele jest około 10^{13} komórek. Przyjmijmy, że jedna komórka ulega mutacji, która pozwala jej dzielić się w sposób niekontrolowany (tzn. staje się komórką nowotworową). Pewne komórki rakowe mogą rosnąć z czasem generacji 24 godz. Ile minie czasu, nim 10^{13} komórek twego ciała stanie się komórkami rakowymi? (Użyj równania $N = N_0 \cdot 2^{t/G}$, gdzie t — czas, G — czas generacji. Wskazówka: 10^{13} równa się ok. 2^{43}).

Pytanie 1-16. Przedyskutuj następujące twierdzenie: „o strukturze i funkcji żywej komórki decydują prawa fizyki i chemii".

Pytanie 1-17. Jaki, jeśli w ogóle, pożytek przynosi wielokomórkowość organizmu?

Pytanie 1-18. Narysuj w jednej skali obwód dwóch kulistych komórek bakterii o średnicy 1 μm i komórki zwierzęcej o średnicy 15 μm. Oblicz dla każdej komórki objętość, powierzchnię i stosunek powierzchni do objętości. Jak będzie się zmieniać ta ostatnia wielkość, jeśli włączysz w obliczenia powierzchni błony wewnątrzkomórkowe (przyjmij, że łączna powierzchnia błon wewnątrzkomórkowych jest piętnaście razy większa od powierzchni błony komórkowej)? (Wzór na objętość kuli: $4/3\pi r^3$, a na jej powierzchnię: $4\pi r^2$, gdzie r — promień). Przedyskutuj hipotezę: „Błony wewnętrzne umożliwiają powstanie większych komórek".

Pytanie 1-19. Jakie argumenty przemawiają za tym, że wszystkie żyjące komórki powstały ze wspólnego przodka — prakomórki? Wyobraź sobie bardzo wczesne dni ewolucji życia na Ziemi. Czy przyjąłbyś, że ta pierwotna komórka była pierwszą i jedyną, jaka mogła powstać?

2

Chemiczne składniki komórek

WIĄZANIA CHEMICZNE

- W skład komórek wchodzi niewiele rodzajów atomów
- O reakcjach między atomami decydują elektrony ich zewnętrznej powłoki
- Wiązania jonowe powstają przez przyjęcie i oddanie elektronów
- Wiązania kowalencyjne powstają przez wspólne użytkowanie elektronów
- Istnieją różne rodzaje wiązań kowalencyjnych
- Substancją najobficiej występującą w komórkach jest woda
- Niektóre polarne cząsteczki w roztworze wodnym tworzą kwasy lub zasady

CZĄSTECZKI W KOMÓRKACH

- Komórkę tworzą związki węgla
- Komórki zawierają cztery główne rodziny małocząsteczkowych związków organicznych
- Cukry są dla komórek źródłem energii i stanowią podjednostki polisacharydów
- Kwasy tłuszczowe są składnikami błon
- Aminokwasy są jednostkami monomerycznymi białek
- Nukleotydy są jednostkami monomerycznymi DNA i RNA
- Makrocząsteczki mają określoną sekwencję jednostek monomerycznych
- Wiązania niekowalencyjne nadają dokładnie określony kształt makrocząsteczkom
- Wiązania niekowalencyjne umożliwiają makrocząsteczkom wybiórcze wiązanie innych cząsteczek

Na podstawie pobieżnych oględzin trudno przyjąć pogląd, że żywe istoty są po prostu układami chemicznymi. Niewiarygodna różnorodność ich form, pozornie celowe zachowywanie się, zdolność do wzrostu i reprodukcji wszystko to wydaje się odróżniać świat istot żywych od świata substancji stałych, cieczy i gazów, opisywanego przez chemię. Dlatego też aż do dziewiętnastego wieku powszechnie uznawano, że zwierzęta zawierają specjalną siłę życiową — *vis vitalis* odpowiedzialną za ich szczególne cechy.

Obecnie wiemy, że w żywych organizmach nie ma niczego, co nie podlegałoby prawom chemii i fizyki. Chemia istot żywych ma jednak swoisty charakter. Po pierwsze, opiera się prawie wyłącznie na związkach węgla, dlatego też ich badanie nazywa się chemią organiczną. Po drugie, zależy od reakcji przebiegających prawie wyłącznie w roztworach wodnych i w stosunkowo wąskim zakresie temperatur spotykanych na Ziemi. Po trzecie, jest ogromnie złożona: nawet najprostsza komórka jest znacznie bardziej skomplikowana pod względem chemicznym, niż jakikolwiek inny znany system chemiczny i — na koniec — jest zdominowana przez ogromne cząsteczki polimerowe, będące łańcuchami kolejno połączonych podjednostek. Unikatowe właściwości tych polimerów umożliwiają komórkom i organizmom wzrost, reprodukcję i dokonywanie tego wszystkiego, co jest charakterystyczne dla życia.

Wiązania chemiczne

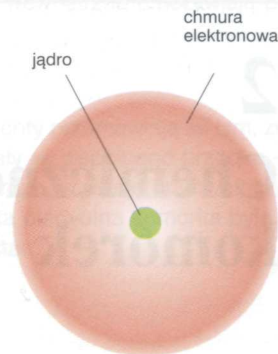
Materia jest kombinacją różnych pierwiastków — substancji takich jak wodór i węgiel, których za pomocą metod chemicznych nie można rozłożyć na substancje prostsze ani przekształcić w inne substancje proste. Najmniejszą cząstką pierwiastka, która jeszcze zachowuje jego właściwości, jest atom. Natomiast cechy charakterystyczne substancji innych niż czyste pierwiastki — łącznie z substancjami stanowiącymi tworzywo żywych komórek — zależą od sposobu łączenia się ich atomów w grupy, stanowiące cząsteczki. Aby zrozumieć, jak żywe organizmy są zbudowane z materii nieożywionej, należy wiedzieć, w jaki sposób powstają wiązania chemiczne, którymi łączą się atomy tworzące cząsteczki.

W skład komórek wchodzi niewiele rodzajów atomów

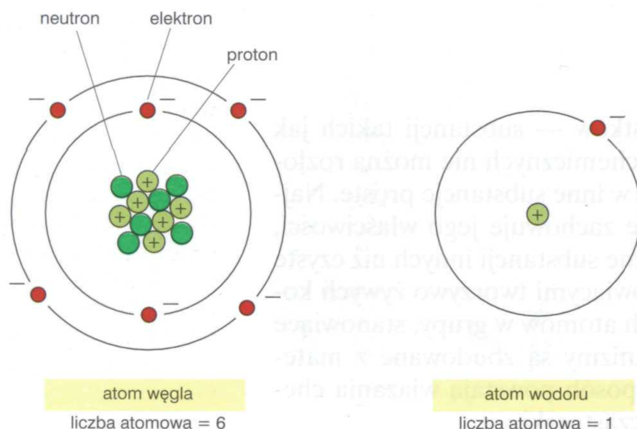
Każdy atom ma w centrum dodatnio naładowane jądro, decydujące o jego masie. W pewnej odległości od jądra znajduje się chmura ujemnie naładowanych **elektronów** (rys. 2-1), utrzymywanych na orbitalach dzięki elektrostatycznemu przyciąganiu przez jądro. Jądro składa się z dwóch rodzajów cząstek subatomowych: dodatnio naładowanych **protonów**, oraz elektrycznie obojętnych *neutronów*. Ilość protonów w jądrze atomu jest równa jego *liczbie atomowej*. Atom wodoru ma jądro zbudowane z pojedynczego protonu; tak więc wodór z liczbą atomową 1, jest najlżejszym pierwiastkiem. Atom węgla ma sześć protonów w jądrze i liczbę atomową 6 (rys. 2-2). Ładunek elektryczny zawarty w każdym protonie ma wielkość dokładnie równą przeciwnemu ładunkowi pojedynczego elektronu. Ponieważ atom jako całość jest elektrycznie obojętny, ilość ujemnie naładowanych elektronów otaczających jądro jest równa ilości dodatnio naładowanych protonów znajdujących się w jądrze; tak więc liczba elektronów w atomie jest równa liczbie atomowej. Wszystkie atomy danego pierwiastka mają tę samą liczbę atomową, która — jak się wkrótce przekonamy — determinuje chemiczne zachowanie się tego pierwiastka.

Neutrony są nienaładowanymi cząstkami subatomowymi o masie zasadniczo takiej samej jak protony. Neutrony przyczyniają się do strukturalnej stabilności jądra — jeśli jest ich za wiele lub za mało, to jądro może ulec rozpadowi promieniotwórczemu — ale nie zmieniają chemicznych właściwości atomu. Pierwiastek może więc istnieć w kilku formach, fizycznie rozróżnialnych, ale chemicznie identycznych. Formy takie nazywamy *izotopami*; każdy izotop danego pierwiastka ma inną liczbę neutronów, ale jednakową liczbę protonów. W stanie naturalnym występują liczne izotopy prawie wszystkich pierwiastków, przy czym niektóre izotopy są nietrwałe. Na przykład, większość węgla na Ziemi występuje w formie trwałego izotopu (węgiel 12) z sześcioma protonami i sześcioma neutronami, istnieją jednak też niewielkie ilości nietrwałego izotopu (radioaktywny węgiel 14), którego atomy zawierają sześć protonów i osiem neutronów. Węgiel 14 ulega powolnemu, ale stałemu rozpadowi promieniotwórczemu, co stanowi podstawę techniki datowania materiału organicznego w badaniach archeologicznych.

Masa atomowa atomu lub **masa cząsteczkowa** cząsteczki jest masą względną w stosunku do masy atomu wodoru. Masa tak zdefiniowana w zasadzie jest równa sumie liczb protonów i neutronów zawartych w atomie lub w cząsteczce, gdyż elektrony są znacznie lżejsze i prawie wcale nie przyczyniają się do masy całości. Tak więc główny izotop węgla ma masę



Rys. 2-1. Schematyczny obraz atomu. Jądro atomu wykazuje dużą gęstość i ma ładunek dodatni. Skupia ono prawie całą masę atomu. Znacznie lżejsze i naładowane ujemnie elektrony bardzo szybko poruszają się wokół jądra zgodnie z prawami mechaniki kwantowej. Elektrony przedstawiono tu jako ciągłą chmurę, ponieważ nie można przewidzieć, gdzie dokładnie znajduje się elektron w danym momencie. Stopień intensywności koloru chmury elektronowej oznacza prawdopodobieństwo znajdowania się elektronu w tym miejscu. Średnica chmury elektronowej waha się od ok. 0,1 nm (dla wodoru) do ok. 0,4 nm (dla atomów o dużej liczbie atomowej). Jądro jest znacznie mniejsze: na przykład jądro atomu węgla ma średnicę ok. $2 \cdot 10^{-5}$ nm.



Rys. 2-2. Schemat atomów węgla i wodoru. Inaczej niż na rys. 2-1, tutaj elektrony przedstawiono jako indywidualne cząstki. Jądro każdego atomu, z wyjątkiem atomu wodoru, składa się z dodatnio naładowanych protonów i obojętnych neutronów. Liczba elektronów w danym atomie równa się liczbie protonów (a tym samym liczbie atomowej), tak więc w sumie atom jest elektroobojętny, jego ładunek netto jest równy zeru. Koncentryczne *czarne koła* przedstawiają bardzo schematycznie orbity elektronowe. Neutrony, protony i elektrony w rzeczywistości są bardzo małe w porównaniu z wielkością całego atomu; ich wymiary na tym rysunku są wyolbrzymione

atomową 12, co zapisujemy ^{12}C, podczas gdy nietrwały izotop, o którym właśnie była mowa, ma masę atomową około 14 i jest opisywany jako 14C. Masę atomu lub cząsteczki często podaje się w *daltonach*, przy czym jeden dalton (1Da) jest jednostką masy w przybliżeniu równą masie atomu wodoru.

Atomy są tak małe, że trudno sobie wyobrazić ich rozmiary. Pojedynczy atom węgla ma średnicę około 0,2 nm; aby z atomów węgla ułożonych liniowo obok siebie uzyskać odcinek o długości 1 mm, należałoby użyć około 5 milionów atomów. Jeden proton lub neutron waży w przybliżeniu $1/(6 \cdot 10^{23})$ grama, tak więc jeden gram wodoru zawiera $6 \cdot 10^{23}$ atomów. Ta olbrzymia liczba ($6 \cdot 10^{23}$, zwana **liczbą Awogadry**) jest podstawowym współczynnikiem, jakim różnią się wielkości spotykane w życiu codziennym od wielkości atomowych i cząsteczkowych. Jeśli jakaś substancja ma masę cząsteczkową równą *M*, to $6 \cdot 10^{23}$ cząsteczek tej substancji ma masę *M* gramów. Taką ilość substancji nazywamy molem (rys. 2-3).

W warunkach naturalnych występują 92 pierwiastki, z których każdy różni się od pozostałych liczbą protonów i elektronów tworzących jego atomy. W skład żywych organizmów wchodzi jednak tylko niewielki zestaw pierwiastków, z którego cztery — węgiel (C), wodór (H), azot (N) i tlen (O) — stanowią aż 96,5% ich masy. Skład żywych organizmów znacznie różni się od składu nieożywionego środowiska mineralnego i jest dowodem szczególnego typu procesów chemicznych zachodzących w żywych organizmach (rys. 2-4). Pierwiastki najpowszechniej występujące w żywych organizmach oraz niektóre cechy ich atomów przedstawiono w tab. 2-1.

Mol jest to *M* gramów substancji, gdzie *M* jest jej względną masą cząsteczkową. Mol zawiera $6 \cdot 10^{23}$ cząsteczek.

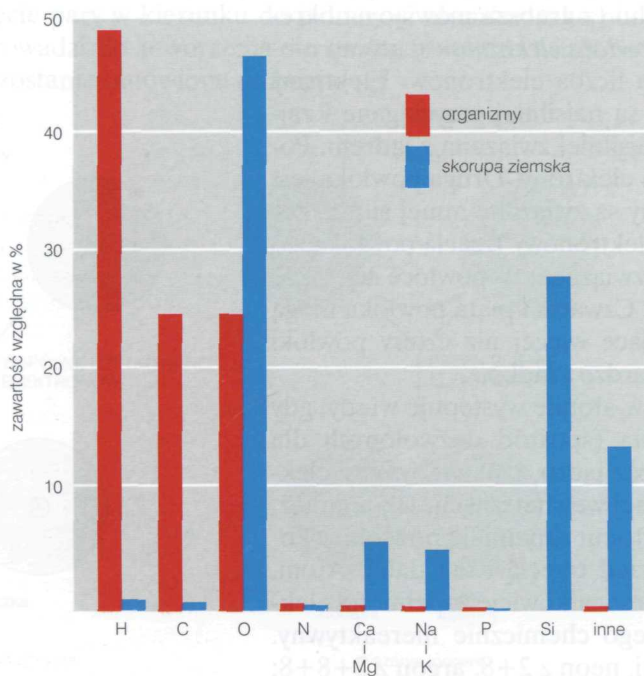
1 mol węgla ma masę 12 g
1 mol glukozy ma masę 180 g
1 mol chlorku sodowego ma masę 58 g

Roztwór molarny (roztwór o stężeniu 1 mol/dm^3) to taki, który w 1 litrze zawiera 1 mol substancji. Jednomolarny (1 M) roztwór glukozy zawiera w 1 l roztworu 180 g glukozy; roztwór milimolarny (1 mM) zawiera 180 mg/l.

Rys. 2-3. Mole i roztwory molarne

O reakcjach między atomami decydują elektrony ich zewnętrznej powłoki

W jaki sposób wiążą się atomy, tworzące cząsteczki, z których są zbudowane żywe organizmy? Aby to zrozumieć, musimy zwrócić szczególną uwagę na ich elektrony. Protony i neutrony są w jądrze atomu ściśle wzajemnie połączone i zmieniają swoich partnerów tylko w skrajnych warunkach



Rys. 2-4. Porównanie udziału niektórych pierwiastków w budowie świata nieożywionego (skorupa ziemska) i tkanek zwierzęcych. Obfitość występowania każdego z pierwiastków przedstawiono tu w formie procentowego udziału atomów danego pierwiastka w stosunku do sumy atomów danej próbki. Na przykład blisko 50% wszystkich atomów żywego organizmu stanowią atomy wodoru. Przedstawiony tu przegląd nie obejmuje zmineralizowanych tkanek, takich jak zęby i kości, gdyż zawierają one dużo nieorganicznego wapnia i fosforu. Wszystkie żyjące organizmy wykazują podobną zawartość poszczególnych pierwiastków

Pierwiastki pospolite w żywych organizmach

Pierwiastek		Protony	Neutrony	Elektrony	Liczba atomowa	Masa atomowa
Wodór	H	1	0	1	1	1
Węgiel	C	6	6	6	6	12
Azot	N	7	7	7	7	14
Tlen	O	8	8	8	8	16

Pierwiastki występujące rzadziej

Pierwiastek		Protony	Neutrony	Elektrony	Liczba atomowa	Masa atomowa
Sód	Na	11	12	11	11	23
Magnez	Mg	12	12	12	12	24
Fosfor	P	15	16	15	15	31
Siarka	Si	16	16	16	16	32
Chlor	Cl	17	18	17	17	35
Potas	K	19	20	19	19	39
Wapń	P	20	20	20	20	40

Tabela 2-1. **Charakterystyka atomów pierwiastków najczęściej występujących w żywych tkankach.** Cztery pierwiastki pokazane na niebieskim tle stanowią 96,5% masy ludzkiego ciała. Każdy z pokazanych na zielonym tle stanowi od 0,1% do 1,5% masy. Liczba atomowa, równa liczbie protonów w jądrze atomu, jednoznacznie definiuje każdy z pierwiastków. Masa atomowa, wynikająca z sumy mas protonów i neutronów w jądrze, może się zmieniać zależnie od izotopu danego pierwiastka. W tabeli podano masy izotopów występujących najczęściej

— podczas rozpadu promieniotwórczego, na przykład we wnętrzu Słońca lub reaktora jądrowego. W żywych tkankach tylko elektrony ulegają przegrupowaniu. Elektrony stanowią zewnętrzny rejon atomu i w chemii wyznaczają reguły łączenia się atomów w cząsteczki.

Elektrony znajdują się w ciągłym ruchu wokół jądra, ale ruch na tę submikroskopową skalę podlega innym prawom niż taki, z którym spotykamy się na co dzień. Prawa te decydują, że elektrony w atomie mogą istnieć tylko w pewnych dyskretnych stanach ruchu (z grubsza mówiąc na określonych orbitalach), oraz że w tej samej *powłoce elektronowej* atomu może się znajdować tylko ściśle ograniczona liczba elektronów. Elektrony ulokowane najbliżej ładunku dodatniego są najsilniej przyciągane i zajmują powłokę najbardziej wewnętrzną, najsilniej związaną z jądrem. Powłoka ta może zawierać maksymalnie dwa elektrony. Druga powłoka jest bardziej oddalona od jądra, a jej elektrony są związane mniej silnie. Powłoka ta może mieć maksymalnie osiem elektronów. Trzecia powłoka zawiera elektrony, które są jeszcze słabiej związane; w powłoce tej także może się znajdować do ośmiu elektronów. Czwarta i piąta powłoka mogą mieć po 18 elektronów. Atomy zawierające więcej niż cztery powłoki w cząsteczkach biologicznych występują bardzo rzadko.

Najbardziej stabilny układ elektronów w atomie występuje wtedy, gdy wszystkie elektrony zajmują te położenia (spośród dozwolonych dla nich), w których są najsilniej wiązane przez jądro, tzn. wtedy, gdy elektrony znajdują się na powłokach najbardziej wewnętrznych. Dlatego też, z wyjątkiem wielkich atomów, elektrony atomu zapełniają powłoki w kolejności: pierwsza przed drugą, druga przed trzecią i tak dalej. Atom, którego najbardziej zewnętrzna powłoka jest całkowicie zapełniona elektronami, jest szczególnie stabilny i dlatego chemicznie niereaktywny. Przykładami mogą być hel z 2 elektronami, neon z 2+8, argon z 2+8+8;

liczba atomowa

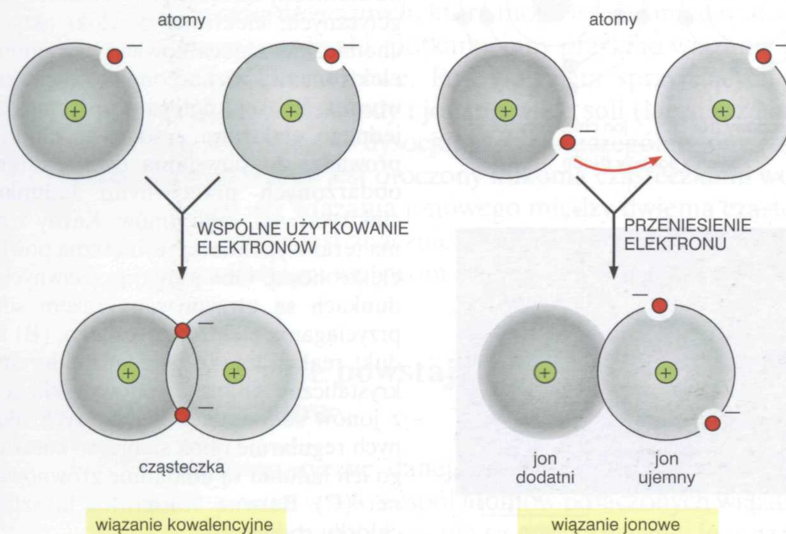
	pierwiastek	I	II	III	IV
1	Wodór	●			
2	Hel	●●			
6	Węgiel	●●	●●●●		
7	Azot	●●	●●●●●		
8	Tlen	●●	●●●●●●		
10	Neon	●●	●●●●●●●●		
11	Sód	●●	●●●●●●●●	●	
12	Magnez	●●	●●●●●●●●	●●	
15	Fosfor	●●	●●●●●●●●	●●●●●	
16	Siarka	●●	●●●●●●●●	●●●●●●	
17	Chlor	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●	
18	Argon	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	
19	Potas	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	●
20	Wapń	●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●	●●

poziom energetyczny (powłoka elektronowa)

Rys. 2-5. Wypełnione i niewypełnione powłoki elektronowe niektórych pierwiastków. Wszystkie pierwiastki powszechnie występujące w żywych organizmach mają niewypełnione zewnętrzne powłoki elektronowe (kolor *czerwony*) i dzięki temu mogą uczestniczyć w reakcjach chemicznych z innymi atomami. Dla porównania pokazano także niektóre pierwiastki, mające całkowicie wypełnione powłoki elektronowe (*żółte* tło); pierwiastki te są chemicznie niereaktywne

wszystkie te pierwiastki są gazami szlachetnymi (nieczynnymi). Przeciwnie — wodór, zawierający tylko 1 elektron i mający dlatego tylko w połowie wypełnioną powłokę, jest bardzo reaktywny. Podobnie inne atomy występujące w żywych tkankach mają niecałkowicie wypełnioną zewnętrzną powłokę elektronową i dzięki temu mogą ze sobą reagować, tworząc cząsteczki (rys. 2-5).

Ponieważ niewypełniona powłoka elektronowa jest mniej stabilna niż powłoka całkowicie wypełniona, atomy z niecałkowicie wypełnionymi zewnętrznymi powłokami elektronowymi mają silną tendencję do interakcji z innymi atomami, podczas których mogą zyskać albo utracić pewną ilość elektronów, tak by w rezultacie ich powłoka zewnętrzna była całkowicie wypełniona elektronami. Wymiana elektronów może się odbywać albo przez przeniesienie elektronu z jednego atomu do drugiego, albo w drodze wspólnego użytkowania elektronów przez dwa atomy. Te dwie strategie są źródłem dwóch typów **wiązań chemicznych** między atomami: kiedy jeden atom przekaże swój elektron drugiemu, tworzy się *wiązanie jonowe*, natomiast *wiązanie kowalencyjne* powstaje wówczas, gdy dwa atomy wspólnie użytkują parę elektronów (rys. 2-6). Udział atomów w wykorzystaniu wspólnej pary elektronów często jest niejednakowy, tzn. następuje częściowe przesunięcie pary w kierunku do jednego z atomów; taka pośrednia strategia prowadzi do utworzenia się *spolaryzowanego wiązania kowalencyjnego*, co zostanie omówione później.



Rys. 2-6. Porównanie wiązań kowalencyjnych i jonowych. Atomy mogą uzyskać stabilniejszy układ elektronów w zewnętrznej powłoce elektronowej przez oddziaływanie z innymi atomami. Gdy elektrony są przekazywane z jednego atomu na drugi, tworzy się wiązanie jonowe. Wiązanie kowalencyjne powstaje, jeśli elektrony są wspólnie użytkowane przez dwa atomy. Przedstawione dwa przypadki ilustrują skrajne sytuacje; często tworzą się wiązania kowalencyjne, w których elektrony są częściowo przesunięte w kierunku jednego z atomów (nierówny udział w użytkowaniu elektronów); tworzy się wtedy wiązanie kowalencyjne spolaryzowane (patrz rys. 2-11)

Atom wodoru (H), który do wypełnienia swojej powłoki elektronowej potrzebuje tylko jeszcze jednego elektronu, osiąga to na ogół tworząc z innym atomem jedno wiązanie kowalencyjne; w wielu przypadkach wiązanie to jest spolaryzowane. Inne najpowszechniejsze pierwiastki żywych komórek — C, N i O z niekompletną drugą powłoką oraz P i S z niekompletną trzecią powłoką (patrz rys. 2-5) na ogół użytkują elektrony wspólnie z innymi atomami i zapewniają sobie kompletność (osiem elektronów) ostatniej powłoki elektronowej, tworząc kilka wiązań kowalencyjnych. Liczbę elektronów, którą atom musi uzyskać lub utracić (w drodze wspólnego użytkowania lub przeniesienia), aby wypełnić zewnętrzną powłokę elektronową, nazywa się jego *wartościowością*.

Decydujący wpływ zewnętrznej powłoki elektronowej na chemiczne właściwości pierwiastków powoduje, że na liście pierwiastków ułożonych w kolejności wzrastających ich liczb atomowych okresowo powtarzają się podobne właściwości pierwiastków. Pierwiastek z niekompletną drugą powłoką, zawierającą jeden elektron, będzie się zachowywał podobnie do pierwiastka z trzecią powłoką obsadzoną przez tylko jeden elektron. Wszystkie metale, na przykład, mają niekompletną zewnętrzną powłokę z jednym lub najwyżej paroma elektronami, natomiast zewnętrzna powłoka gazów szlachetnych, o czym już wspomniano, jest całkowicie wypełniona.

Pytanie 2-1. Atom węgla zawiera sześć protonów i sześć neutronów.

A. Jaka jest liczba atomowa i masa atomowa węgla?

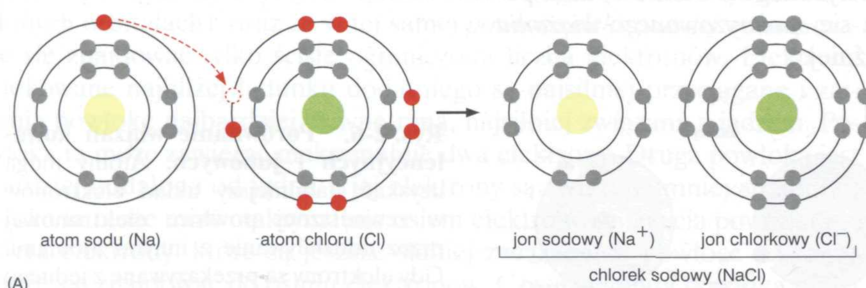
B. Ile elektronów ma atom węgla?

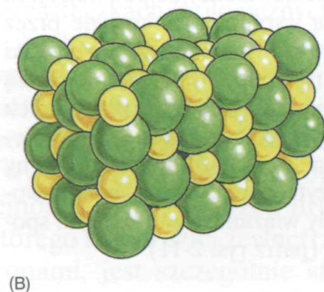
C. Ile elektronów musi przyłączyć, by uzyskać całkowicie wypełnioną zewnętrzną powłokę elektronową?

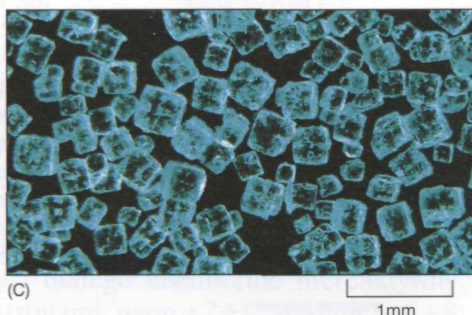
D. Węgiel o masie atomowej 14 jest promieniotwórczy. Czym strukturalnie różni się on od węgla nieradioaktywnego? Czy ta różnica ma wpływ na jego właściwości chemiczne?

Wiązania jonowe powstają przez przyjęcie i oddanie elektronów

Wiązania jonowe najłatwiej jest tworzyć atomom, które na zewnętrznej powłoce zawierają zaledwie jeden lub dwa elektrony, lub którym do skompletowania zewnętrznej powłoki brakuje jednego lub dwóch elektronów. Takie atomy osiągają kompletną zewnętrzną powłokę elektronową łatwiej poprzez przeniesienie elektronów z lub do innego atomu, niż w drodze wspólnego użytkowania elektronów z innym atomem. Na przykład na rys. 2-5 widzimy, że atom sodu (Na) o liczbie atomowej 11 może oddać jeden elektron, uzyskując dzięki temu całkowicie wypełnioną







Rys. 2-7. Chlorek sodowy: przykład powstawania wiązania jonowego. (A) Atom sodu (Na) reaguje z atomem chloru (Cl). W każdym z atomów pokazano elektrony na różnych poziomach energetycznych; elektrony powłoki aktywnej chemicznie (niecałkowicie wypełnionej elektronami) zaznaczono kolorem *czerwonym*. Reakcja polega na przeniesieniu jednego elektronu z sodu na chlor, co prowadzi do powstania dwóch atomów obdarzonych przeciwnymi ładunkami elektrycznymi, czyli jonów. Każdy z nich ma teraz wypełnioną zewnętrzną powłokę elektronową. Oba jony o przeciwnych ładunkach są utrzymywane razem siłami przyciągania elektrostatycznego. (B) Produkt reakcji między sodem i chlorem — krystaliczny chlorek sodowy składa się z jonów sodowych i chlorkowych ułożonych regularnie obok siebie, wskutek czego ich ładunki są dokładnie zrównoważone. (C) Barwna fotografia kryształów chlorku sodowego

Wiązania kowalencyjne i niekowalencyjne

Rodzaj wiązania	Długość (nm)	Energia (kJ/mol) w próżni	Energia (kJ/mol) w wodzie
Kowalencyjne	0,15	376,6	376,6
Niekowalencyjne: jonowe	0,25	334,7	12,6
wodorowe	0,30	16,7	4,2
oddziaływania van der Waalsa (na 1 atom)	0,35	0,4	0,4

Tabela 2-2. Kowalencyjne i niekowalencyjne wiązania chemiczne. Siłę wiązania mierzy się ilością energii potrzebną do jego zerwania, wyrażaną w kilokaloriach na mol lub kilodżulach na mol (definicje tych jednostek podano w Słowniczku). Długość wiązania wodorowego X...H...X jest to odległość między dwoma atomami X, nie będącymi wodorem. Wartości dotyczące siły i długości wiązań podano w przybliżeniu, ponieważ zależą od rodzaju atomów tworzących wiązanie. Różne rodzaje wiązań niekowalencyjnych omówiono w dalszej części rozdziału (patrz panel 2-7, s. 70-71)

elektronami powłokę drugą jako powłokę zewnętrzną. Przeciwnie, atom chloru (Cl) o liczbie atomowej 17 może skompletować zewnętrzna powłokę przyjmując tylko jeden elektron. W konsekwencji, jeśli atom Na napotka atom Cl, elektron z atomu Na może przeskoczyć na atom Cl, co zapewnia obydwu atomom wypełnione zewnętrzne powłoki elektronowe. Potomkiem takiego małżeństwa sodu, miękkiego i bardzo reaktywnego metalu, z chlorem — trującym zielonkawym gazem — jest sól jadalna (NaCl).

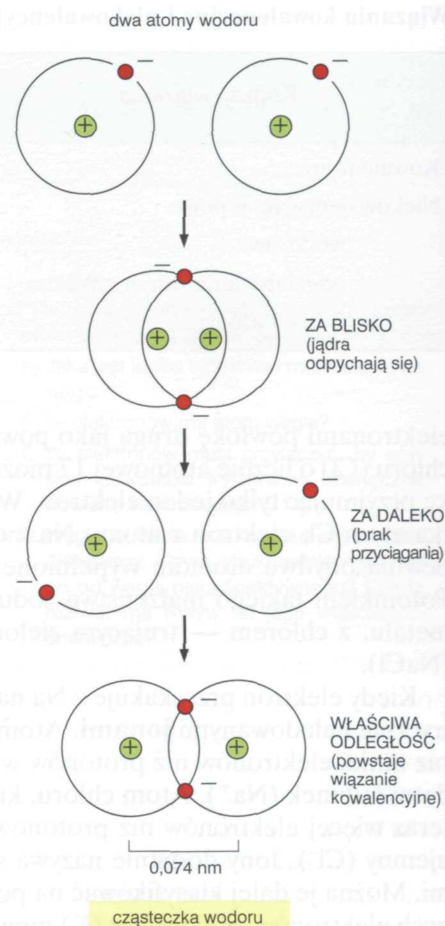
Kiedy elektron przeskakuje z Na na Cl, to obydwa atomy stają się elektrycznie naładowanymi **jonami**. Atom Na, który utracił 1 elektron, ma teraz mniej elektronów niż protonów w jądrze; dlatego ma pojedynczy dodatni ładunek (Na^+). Atom chloru, który przyjął jeden elektron, zawiera teraz więcej elektronów niż protonów i dlatego ma pojedynczy ładunek ujemny (Cl^-). Jony dodatnie nazywa się kationami, a ujemne — anionami. Można je dalej klasyfikować na podstawie liczby przyjętych lub oddanych elektronów. Sód i potas (K) mogą oddać po jednym elektronie, tworząc jony o pojedynczym ładunku dodatnim (Na^+ i K^+), natomiast magnez i wapń mogą utracić po dwa elektrony i utworzyć kationy z podwójnym ładunkiem dodatnim (Mg^{2+}, Ca^{2+}).

Ze względu na przeciwne ładunki, Na^+ i Cl^- wzajemnie się przyciągają i łączą się **wiązaniem jonowym**. Kryształek soli kuchennej o przekroju ok. 1 mm zawiera astronomiczną liczbę ($2 \cdot 10^{19}$) jonów każdego rodzaju (Na^+ i Cl^-), precyzyjnie upakowanych w trójwymiarowym układzie, w którym przeciwne ładunki jonów są doskonale zrównoważone (rys. 2-7). Substancje takie jak NaCl, utrzymywane wyłącznie przez wiązania jonowe, są nazywane raczej *solami* niż cząsteczkami. Wiązania jonowe są tylko jednym z typów *wiązań niekowalencyjnych*, które mogą istnieć między atomami. W dalszej części tego rozdziału spotkamy inny przykład wiązania niekowalencyjnego, wiązanie wodorowe. Pod wpływem sprzyjających oddziaływań między cząsteczkami wody i jonami wiele soli (łącznie z NaCl) łatwo rozpuszcza się w wodzie — dysocjując na poszczególne jony (takie jak Na^+ i Cl^-), z których każdy jest otoczony kilkoma cząsteczkami wody. Z tego samego powodu siła wiązania jonowego między dwiema cząsteczkami w środowisku wodnym jest znacznie zredukowana. Wiązania kowalencyjne nie ulegają podobnym wpływom (tab. 2-2).

Wiązania kowalencyjne powstają przez wspólne użytkowanie elektronów

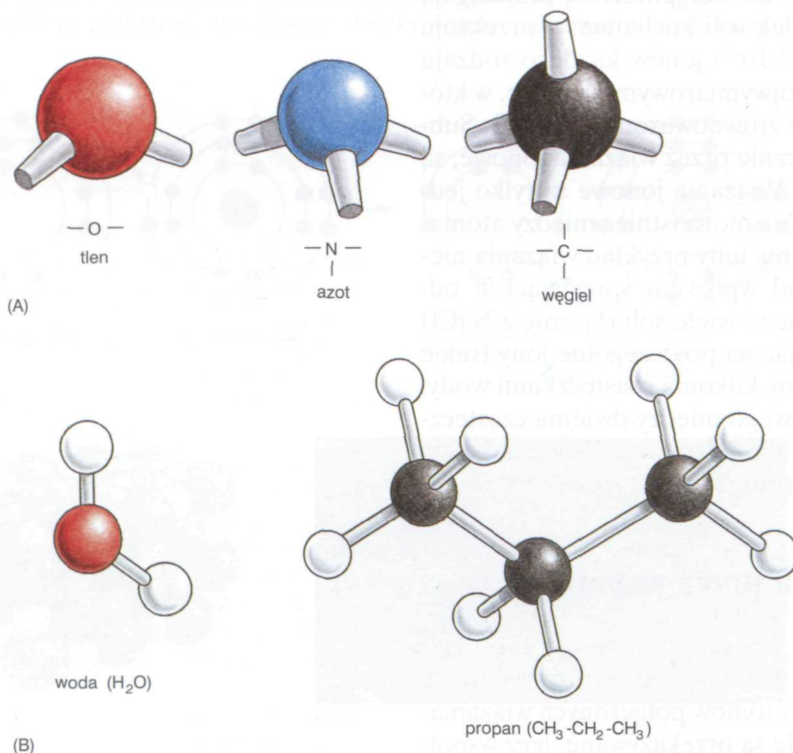
Wszystkie cechy charakterystyczne danej komórki zależą od zawartych w niej cząsteczek. Cząsteczka jest to zespół atomów połączonych wiązaniami kowalencyjnymi, w których elektrony nie są przekazywane, lecz wspól-

Rys. 2-8. Cząsteczka wodoru: prosty przykład powstawania wiązania kowalencyjnego. Każdy izolowany atom wodoru ma tylko jeden elektron, a więc jego pierwsza powłoka elektronowa nie jest całkowicie wypełniona. Po odpowiednim zbliżeniu dwa atomy mogą wspólnie wykorzystywać obydwa elektrony (z których każdy pochodzi od innego atomu) i uzyskać dzięki temu kompletną powłokę elektronową. Elektrony dostosowują przy tym swoje orbitale tak, by były nimi objęte obydwa jądra atomowe. Wiązanie kowalencyjne między tymi dwoma atomami ma określoną długość. Gdyby atomy bardziej zbliżyły się do siebie, to dodatnie ładunki ich jąder wzajemnie by się odpychały; jeśli odległość między atomami byłaby większa od długości wiązania, to nie mogłyby wspólnie użytkować elektronów



nie użytkowane przez atomy tworzące wiązanie. Wspólnie użytkowane elektrony wypełniają zewnętrzne powłoki obu atomów. W najprostszej możliwej cząsteczce — cząsteczce wodoru (H_2) dwa atomy H, z których każdy ma po jednym elektronie, wspólnie użytkują obydwa elektrony, dzięki czemu obydwa atomy uzyskują liczbę (2) elektronów potrzebną do wypełnienia pierwszej powłoki elektronowej. Wspólne elektrony tworzą chmurę ładunku ujemnego o największym zagęszczeniu pomiędzy dwoma dodatnio naładowanym jądrami, co decyduje o ich utrzymywaniu się obok siebie, na przekór wzajemnemu odpychaniu się jednoimiennych ładunków, które powodowałoby oddalanie się obu atomów. Gdy dwa jądra atomowe znajdują się w charakterystycznej odległości, zwanej *długością wiązania*, siły przyciągania i odpychania zostają zrównoważone (rys. 2-8).

Dalszą istotną cechą każdego wiązania — kowalencyjnego i niekowalencyjnego — jest jego siła. *Siłę wiązania* mierzy się ilością energii, której potrzeba, aby zerwać to wiązanie, wyrażaną zwykle w kilokaloriach na mol (kcal/mol). Przypomnijmy, że kilokaloria jest ilością energii potrzebną do podwyższenia temperatury jednego litra wody o jeden stopień Celsjusza. Tak więc jeśli do zerwania $6 \cdot 10^{23}$ wiązań określonego typu (tj. do zerwania 1 mola takich wiązań) potrzeba 1 kilokalorii, to siła tego wiązania wynosi 1 kcal/mol. Typowe wartości długości i siły wiązań różnego



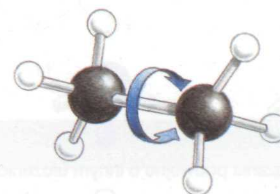
Rys. 2-9. Geometria wiązań kowalencyjnych. (A) Przestrzenne rozmieszczenie wiązań kowalencyjnych tworzonych przez tlen, azot i węgiel. (B) Cząsteczki utworzone przez te atomy mają dokładnie określoną strukturę przestrzenną, co pokazano tutaj dla wody i propanu. Strukturę ich określają kąty i długości wiązań. Na przykład cząsteczka wody ma kształt litery V z kątem bliskim 109°

typu przedstawiono w tab. 2-2. Często używaną miarą energii jest też kilodżul, równoważny 0,239 kilokalorii.

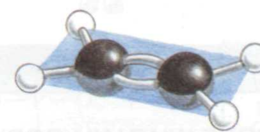
Aby lepiej wyobrazić sobie znaczenie *siły wiązania*, dobrze jest porównać ją z przeciętną energią zderzeń, którym cząsteczki stale ulegają (tj. z ich energią cieplną). Wartość energetyczna przeciętnego wiązania kowalencyjnego jest ok. 100 razy większa od energii cieplnej cząsteczek, więc atomy połączone takim wiązaniem nie mogą ulec oddzieleniu podczas termicznych ruchów cząsteczki. Wiązania kowalencyjne są normalnie zrywane tylko podczas reakcji chemicznych z innymi atomami lub cząsteczkami. Tworzenie i zrywanie wiązań kowalencyjnych zachodzi gwałtownie; w żywych komórkach procesy te są dokładnie kontrolowane przez wysoce specyficzne katalizatory, nazywane *enzymami*. Wiązania niekowalencyjne z reguły są znacznie słabsze; w dalszej części rozdziału zobaczymy, że w komórce są one ważne w wielu sytuacjach, w których cząsteczki muszą łatwo asocjować i dysocjować, aby wypełnić swe funkcje.

Atom wodoru może tworzyć tylko jedno wiązanie kowalencyjne; inne atomy pospolite w żywych komórkach — O, N, S, P oraz najważniejszy C — mogą tworzyć więcej niż jedno wiązanie kowalencyjne. Jak poprzednio wskazano, zewnętrzna powłoka elektronowa tych atomów może zawierać do ośmiu elektronów. Atomy te tworzą wiązania kowalencyjne z tyloma innymi atomami, ile jest niezbędnych do osiągnięcia ośmioelektronowej powłoki zewnętrznej. Atom tlenu, zawierający w zewnętrznej powłoce sześć elektronów, jest najstabilniejszy po uzyskaniu dodatkowo dwóch elektronów przez wspólne ich użytkowanie z innymi atomami i dlatego tworzy najwyżej dwa wiązania kowalencyjne. Azot z pięcioma elektronami w powłoce zewnętrznej tworzy maksymalnie trzy wiązania kowalencyjne, natomiast atom węgla, mający tam cztery elektrony, może tworzyć do czterech wiązań kowalencyjnych, wykorzystując wspólnie z innymi atomami cztery pary elektronów (patrz rys. 2-5).

Jeśli jeden atom tworzy kowalencyjne wiązania z kilkoma innymi, to wiązania te są przestrzennie wzajemnie zorientowane w sposób dokładnie określony przez ułożenie w przestrzenni orbit wspólnych elektronów. Kowalencyjne wiązania między wieloma atomami charakteryzują się dlatego specyficznymi kątami wiązań oraz długością wiązań i ich energią (rys. 2-9). Cztery wiązania kowalencyjne tworzone przez atom węgla są na przykład tak ułożone, jakby wskazywały cztery wierzchołki regularnego tetraedru (czworościanu). Precyzyjne zorientowanie wiązań kowalencyjnych stanowi podstawę geometrii przestrzennej cząsteczek organicznych.



(A) etan



(B) eten

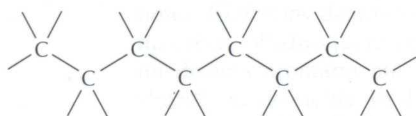
Rys. 2-10. Porównanie podwójnego wiązania węgiel–węgiel z wiązaniem pojedynczym. (A) Cząsteczka etanu z pojedynczym wiązaniem pomiędzy atomami węgla ilustruje tetraedryczne (czworościenne) rozmieszczenie pojedynczych wiązań kowalencyjnych tworzonych przez węgiel. Jedna z grup CH_3, połączonych pojedynczym wiązaniem kowalencyjnym, może obracać się wokół osi tego wiązania w stosunku do drugiej. (B) Podwójne wiązanie między dwoma atomami węgla w cząsteczce etenu (etylenu) zmienia geometrię wiązań i umieszcza wszystkie atomy w jednej płaszczyźnie. Podwójne wiązanie uniemożliwia rotację jednej grupy CH_2 względem drugiej

Istnieją różne rodzaje wiązań kowalencyjnych

Większość wiązań kowalencyjnych polega na wspólnym użytkowaniu dwóch elektronów, z których każdy pochodzi od jednego z dwóch atomów tworzących *wiązanie pojedyncze*. Niektóre jednak wiązania kowalencyjne polegają na wspólnym użytkowaniu więcej niż jednej pary elektronów. Wspólnie mogą być użytkowane np. dwie pary elektronów (tj. cztery elektrony), przy czym w utworzeniu 2 wspólnych par uczestniczą po dwa elektrony każdego z atomów tworzących wiązanie; takie wiązanie nazywa się *wiązaniem podwójnym*. Podwójne wiązania są krótsze i silniejsze niż wiązania pojedyncze i wywierają charakterystyczny wpływ na geometrię przestrzenną zawierających je związków. Pojedyncze wiązanie kowalencyjne między dwoma atomami zwykle umożliwia obrót jednej części cząsteczki w stosunku do drugiej wokół osi wiązania. Wiązanie podwójne wyklucza tego rodzaju rotację, powodując sztywniejszy i mniej elastyczny układ atomów. (rys. 2-10 oraz panel 2-1, s. 46–47).

SZKIELETY WĘGLOWE

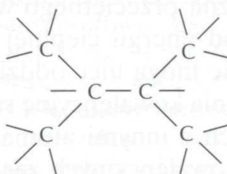
Węgiel w komórkach pełni unikatową rolę, ponieważ ma zdolność do tworzenia silnych wiązań kowalencyjnych z innymi atomami węgla. Dzięki temu atomy węgla mogą łączyć się w długie liniowe łańcuchy



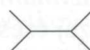
można to zapisać



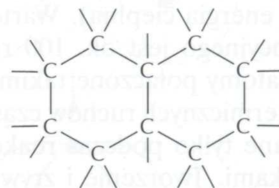
albo łańcuchy rozgałęzione



można to zapisać



lub pierścienie

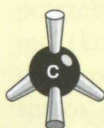


można to zapisać



WIĄZANIA KOWALENCYJNE

Wiązanie kowalencyjne powstaje, gdy dwa atomy zbliżą się do siebie na małą odległość i wspólnie użytkują jeden lub więcej elektronów. W pojedynczym wiązaniu każdy z dwóch atomów przekazuje do wspólnego użytku po jednym elektronie. W wiązaniu podwójnym atomy wykorzystują wspólnie cztery elektrony. Każdy atom tworzy stałą liczbę wiązań kowalencyjnych o zdefiniowanym, przestrzennym ułożeniu. Na przykład węgiel tworzy cztery wiązania pojedyncze ułożone tetraedrycznie, natomiast azot tworzy trzy, a tlen dwa pojedyncze wiązania ułożone w przedstawiony sposób





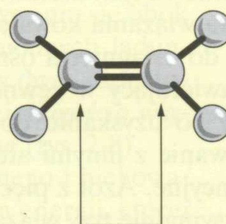


Istnieją wiązania podwójne o innym ułożeniu przestrzennym:





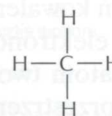




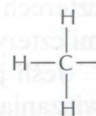
Atomy połączone dwoma lub więcej wiązaniami kowalencyjnymi nie mogą się swobodnie obracać wokół osi wiązania. Ograniczenie to jest decydującym czynnikiem wpływającym na trójwymiarowy kształt wielu makrocząsteczek

ZWIĄZKI C—H

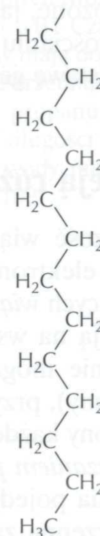
Węgiel tworzy z wodorem trwałe związki (lub grupy) nazywane węglowodorowymi. Są one niepolarne, nie tworzą wiązań wodorowych i nie rozpuszczają się w wodzie



metan



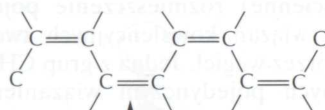
grupa metylowa



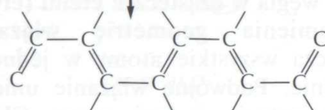
fragment węglowodorowego „ogona" cząsteczki kwasu tłuszczowego

SPRZĘŻONE WIĄZANIA PODWÓJNE

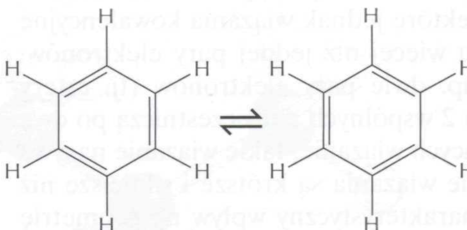
W łańcuchu węglowym mogą występować wiązania podwójne. Jeśli występują one na przemian z wiązaniami pojedynczymi, to wiążące elektrony przemieszczają się w obrębie całej cząsteczki i stabilizują ją; zjawisko to nazywamy rezonansem



prawdziwa struktura zajmuje położenie pośrednie między tymi dwiema skrajnymi możliwościami

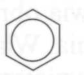


Sprzężone wiązania podwójne w związku pierścieniowym mogą tworzyć bardzo stabilną strukturę



benzen

często przedstawiany jako

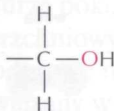


 Panel 2-1. Wiązania i grupy chemiczne powszechnie występujące w cząsteczkach biologicznych

ZWIĄZKI C—O

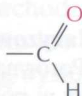
Wiele biologicznie ważnych związków zawiera węgiel połączony z tlenem. Na przykład

alkohol

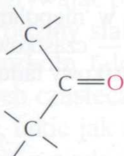


grupa —OH nazywa się grupą hydroksylową

aldehyd

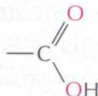


keton



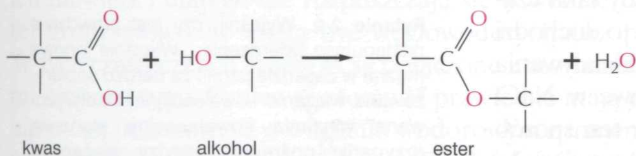
grupa C ═ O nazywa się grupą karbonylową

kwas karboksylowy



—COOH nazywa się grupą karboksylową. W wodzie ta grupa traci jon H^+ i staje się anionem —COO^-

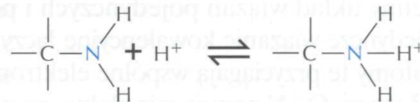
estry Estry powstają przez połączenie kwasu z alkoholem



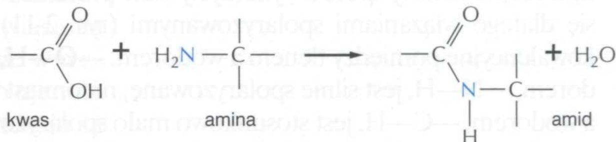
ZWIĄZKI C—N

Dwiema ważnymi grupami związków zawierających węgiel połączony z azotem są aminy i amidy.

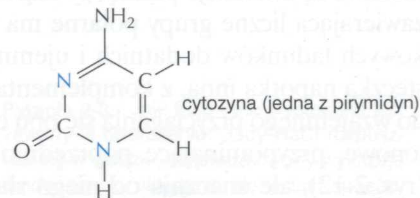
Aminy w środowisku wodnym wiążą jon H^+ i w ten sposób uzyskują ładunek dodatni



Amidy powstają przez połączenie się kwasu z aminą. W przeciwieństwie do amin w środowisku wodnym amidy nie mają ładunku. Wiązanie peptydowe, którym są połączone aminokwasy w białkach, może być przykładem amidów

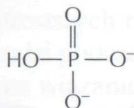


Azot występuje także w niektórych związkach cyklicznych, w tym w ważnych składnikach kwasów nukleinowych – purynach i pirymidynach

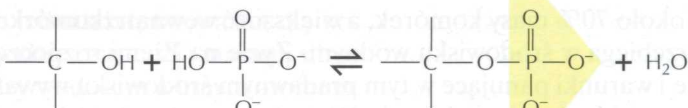


FOSFORANY

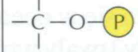
Nieorganiczny fosforan jest stabilnym jonem pochodzącym z kwasu fosforowego, H_3PO_4. Często w skrótowej formie jest zapisywany jako P_i



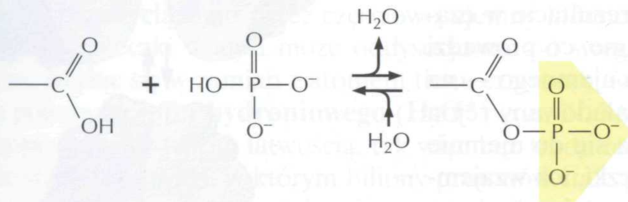
Reagując z wolnymi grupami hydroksylowymi fosforany mogą tworzyć estry. Często grupy fosforanowe są w ten sposób połączone z białkami



można to zapisać

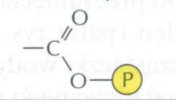


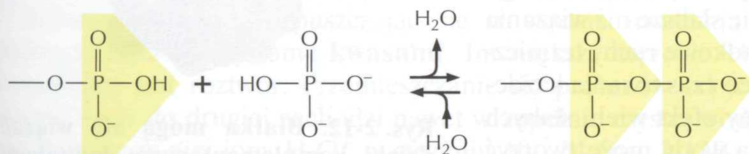
Połączenie dwóch lub więcej grup fosforanowych albo połączenie fosforanu z grupą karboksylową daje bezwodnik kwasowy



„wysokoenergetyczne" wiązanie acylofosforanowe (bezwodnik kwasowy fosforanu i grupy karboksylowej) występuje w niektórych metabolitach

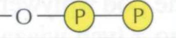
można to zapisać



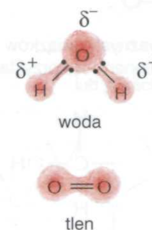


„wysokoenergetyczne" wiązanie fosfobezwodnikowe występuje w cząsteczkach takich jak ATP

można to zapisać



Niektóre cząsteczki zawierają ciągi wiązań wspólnie wykorzystujących elektrony i wskutek tego mających charakter pośredni między wiązaniem pojedynczym i podwójnym. Bardzo stabilna cząsteczka benzenu, na przykład, zawiera pierścień sześciu atomów węgla, w którym elektrony wiążące są równomiernie rozmieszczone (co jednak zwykle przedstawia się jako przemienny układ wiązań pojedynczych i podwójnych — patrz panel 2-1). Jeśli pojedyncze wiązanie kowalencyjne łączy atomy różnych pierwiastków, to zwykle atomy te przyciągają wspólne elektrony w niejednakowym stopniu. Na przykład atomy O i N przyciągają elektrony stosunkowo silniej niż atom C, natomiast atom H przyciąga je słabiej niż atom C. Struktura, w której ładunek dodatni jest zagęszczony w pobliżu jednego końca (biegun dodatni), a ładunek ujemny w pobliżu drugiego (biegun ujemny), jest z definicji określana jako struktura **polarna** (biegunowa). Wiązania kowalencyjne, w których elektrony są w niejednakowy sposób wykorzystywane przez dwa związane atomy, nazywa się dlatego wiązaniami spolaryzowanymi (rys. 2-11). Na przykład, wiązanie kowalencyjne pomiędzy tlenem a wodorem, —O—H, lub między azotem i wodorem, —N—H, jest silnie spolaryzowane, natomiast wiązanie między węglem a wodorem, —C—H, jest stosunkowo mało spolaryzowane, gdyż wiążące elektrony są przyciągane prawie w jednakowym stopniu przez obydwa atomy.



Rys. 2-11. Spolaryzowane wiązanie kowalencyjne. Porównano tu rozmieszczenie elektronów w polarnej cząsteczce wody (H_2O) i w niepolarnej cząsteczce tlenu (O_2); δ^+ — cząstkowy ładunek dodatni, δ^- — cząstkowy ładunek ujemny

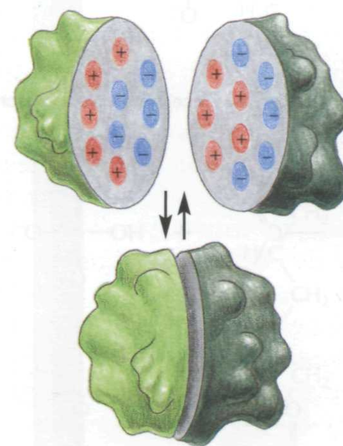
Spolaryzowane wiązania kowalencyjne są w biologii bardzo ważne, ponieważ w wyniku powstających dzięki nim cząstkowych ładunków elektrycznych, możliwe są interakcje pomiędzy cząsteczkami. Jakakolwiek wielka cząsteczka zawierająca liczne grupy polarne ma typowy dla siebie wzór ułożenia cząstkowych ładunków dodatnich i ujemnych na jej powierzchni. Gdy taka cząsteczka napotka inną, z komplementarnym układem ładunków, to dochodzi do wzajemnego przyciągania się obu cząsteczek poprzez słabe oddziaływania jonowe, przypominające poprzednio omówione wiązanie jonowe w NaCl (rys. 2-12), ale znacznie od niego słabsze. Jeśli wytworzy się w ten sposób dostatecznie dużo słabych wiązań niekowalencyjnych pomiędzy powierzchniami styku 2 cząsteczek, to dochodzi do ich specyficznego łączenia się (niekowalencyjnego), co opisano w dalszej części tego rozdziału.

Pytanie 2-2. Wyjaśnij, czy jest prawdziwe następujące twierdzenie: „Wiązanie jonowe można w zasadzie uznać za bardzo spolaryzowane wiązanie kowalencyjne. Spolaryzowane wiązania kowalencyjne stanowią przypadki pośrednie między wiązaniem jonowym a wiązaniem kowalencyjnym nie spolaryzowanym".

Substancją najobficiej występującą w komórkach jest woda

Woda stanowi około 70% masy komórek, a większość wewnątrzkomórkowych reakcji przebiega w środowisku wodnym. Życie na Ziemi rozpoczęło się w oceanie i warunki panujące w tym pradawnym środowisku wywarły trwały wpływ na chemizm istot żywych. Dlatego o procesach życiowych decydują właściwości wody (panel 2-2, s. 50–51).

W każdej cząsteczce wody (H_2O) dwa atomy wodoru są kowalencyjnie związane z atomem tlenu. Wiązania te są silnie spolaryzowane, ponieważ tlen przyciąga elektrony znacznie silniej niż wodór. W rezultacie w cząsteczce wody elektrony są nierównomiernie rozmieszczone, co prowadzi do przesunięcia ładunku dodatniego na atomy wodoru, a ujemnego — na tlen (patrz rys. 2-11 oraz panel 2-2). Kiedy dodatnio naładowany rejon cząsteczki wody (tzn. jeden z atomów wodoru) przybliża się do ujemnie naładowanego rejonu (czyli atomu tlenu) drugiej cząsteczki, ich wzajemne przyciąganie się prowadzi do powstania słabego wiązania, zwanego **wiązaniem wodorowym**. Wiązania takie są znacznie słabsze niż wiązania kowalencyjne i ulegają łatwo zerwaniu przez przypadkowe ruchy termiczne pod wpływem energii cieplnej cząsteczek, przez co czas trwania każdego z tych wiązań jest bardzo krótki. Ale sumaryczny efekt wielu słabych wiązań bynajmniej nie jest mały. Każda cząsteczka wody może tworzyć wiązania wodorowe poprzez swoje dwa atomy H z dwiema innymi



Rys. 2-12. Białka mogą się wiązać dzięki komplementarnym ładunkom na powierzchni

cząsteczkami, co prowadzi do powstania całej sieci, w której wiązania wodorowe stale ulegają zrywaniu i ponownemu tworzeniu (panel 2-2). Tylko dzięki wiązaniom wodorowym łączącym poszczególne cząsteczki woda jest w temperaturze pokojowej cieczą o wysokim punkcie wrzenia i dużym napięciu powierzchniowym, a nie gazem.

Wiązania wodorowe mogą tworzyć się zawsze wtedy, gdy dodatnio naładowany H, związany w jednej cząsteczce przez spolaryzowane wiązanie kowalencyjne, wchodzi w bliski kontakt z atomem naładowanym ujemnie — typowo tlenem lub azotem — należącym do innej cząsteczki. Wiązania wodorowe mogą występować także między różnymi częściami jednej dużej cząsteczki, odgrywając przy tym istotną rolę w stabilizacji jej struktury. Należą one do rodziny słabych wiązań niekowalencyjnych, umożliwiających dużym cząsteczkom fałdowanie się w unikatowy sposób oraz wybiórcze wiązanie innych cząsteczek, co omówiono w dalszej części tego rozdziału.

Cząsteczki, takie jak alkohole, które zawierają spolaryzowane wiązania i mogą tworzyć z wodą wiązania wodorowe, łatwo rozpuszczają się w wodzie. Jak wspomniano poprzednio, cząsteczki noszące dodatnie lub ujemne ładunki (jony) także chętnie oddziałują z wodą. Cząsteczki tego rodzaju są nazwane *hydrofilowymi*, co dosłownie oznacza, że lubią wodę. Do tej kategorii siłą rzeczy należy duża część cząsteczek znajdujących się w wodnym środowisku komórki, z cukrami, DNA, RNA oraz większością białek włącznie. Przeciwnie zachowują się cząsteczki *hydrofobowe* (nie lubiące wody): nie mają ładunku elektrycznego, nie tworzą wiązań wodorowych lub tworzą ich niewiele i dlatego nie rozpuszczają się w wodzie. Ważnym przykładem tej grupy związków mogą być węglowodory (patrz panel 2-1, s. 46–47). W tych cząsteczkach atomy H są połączone z atomami C głównie wiązaniami niepolarnymi. Ponieważ atomy H prawie nie mają dodatniego ładunku, nie mogą uczestniczyć w wiązaniu wodorowym z innymi cząsteczkami. Dlatego węglowodory są hydrofobowe. Tę właściwość węglowodorów wykorzystują komórki do konstruowania błon komórkowych z cząsteczek zawierających długie „ogony" węglowodorowe, z czym spotkamy się w rozdz. 11.

Pytanie 2-3. Jaki błąd (jeśli występuje) jest zawarty w twierdzeniu: „Gdy NaCl rozpuszcza się w wodzie, cząsteczki wody wykazują tendencję do układania się w taki sposób, by ich atomy tlenu zwracały się w kierunku do jonów sodowych, a odwracały się od jonów chlorkowych". Uzasadnij odpowiedź.

Niektóre polarne cząsteczki w roztworze wodnym tworzą kwasy lub zasady

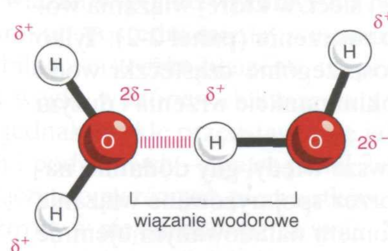
Jedna z najprostszych reakcji, równocześnie jednak bardzo ważna dla komórek, zachodzi podczas rozpuszczania w wodzie cząsteczki mającej silnie spolaryzowane wiązanie kowalencyjne między wodorem a innym atomem. W takiej cząsteczce atom wodoru w dużym stopniu oddaje swój elektron towarzyszącemu atomowi i w rezultacie istnieje w formie nagiego, dodatnio naładowanego jądra wodorowego — innymi słowy w formie *protonu* (H^+). Kiedy polarna cząsteczka znajdzie się w otoczeniu cząsteczek wody, proton ulega przyciąganiu przez częściowo ujemny ładunek atomu O sąsiadującej cząsteczki wody i może oddysocjować od swego pierwotnego partnera, wiążąc się w zamian z atomem tlenu cząsteczki wody, co prowadzi do powstania **jonu hydroniowego (H_3O^+)** (rys. 2-13A). Reakcja odwrotna przebiega z równą łatwością, tak więc bez trudu można sobie wyobrazić stan równowagi, w którym biliony protonów stale przemieszczają się od jednej cząsteczki zawartej w roztworze do drugiej.

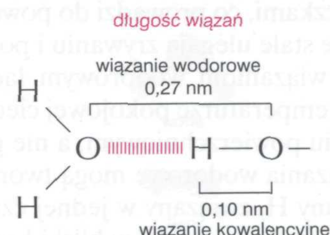
Substancje, które rozpuszczając się w wodzie uwalniają protony, tworzące H_3O^+, nazywamy **kwasami**. Im większe stężenie H_3O^+, tym kwaśniejszy jest roztwór. Przemieszczanie się protonów od jednej cząsteczki wody do drugiej zachodzi nawet w zupełnie czystej wodzie, toteż znajdują się w niej jony H_3O^+ w stężeniu 10^{-7} M (rys. 2-13B). Stężenie H_3O^+ tradycyjnie jest określane jako stężenie H^+, chociaż większość H^+

WIĄZANIA WODOROWE

Dwie przyległe cząsteczki wody, ponieważ są spolaryzowane, mogą się łączyć wiązaniem wodorowym. Wiązania wodorowe są ok. 20 razy słabsze od wiązań kowalencyjnych

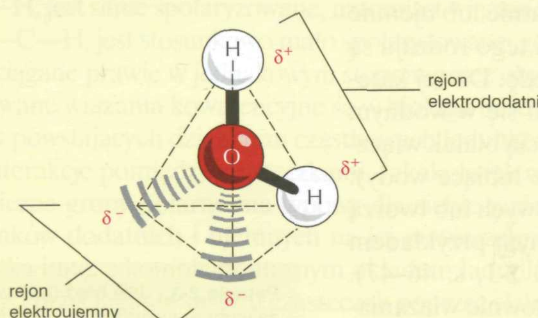
Wiązania wodorowe są najsilniejsze wtedy, gdy trzy atomy są ułożone liniowo





WODA

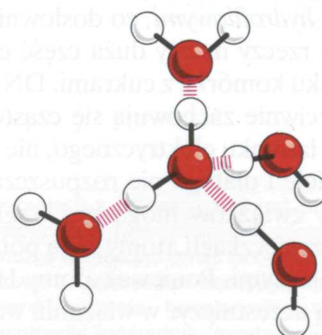
Dwa atomy połączone wiązaniem kowalencyjnym mogą w niejednakowy sposób przyciągać elektrony tworzące wiązanie. W takich przypadkach wiązanie jest spolaryzowane. Jeden z jego końców ma cząstkowy ładunek ujemny (δ⁻), drugi – cząstkowy ładunek dodatni (δ⁺)



Wprawdzie wypadkowy ładunek cząsteczki wody jest obojętny (jednakowa ilość elektronów i protonów), elektrony są jednak rozmieszczone asymetrycznie, co nadaje cząsteczce charakter polarny. Jądro atomu tlenu odciąga elektrony od jąder wodorowych, wskutek czego atomy wodoru uzyskują mały ładunek dodatni. Zwiększenie gęstości elektronowej przy atomie tlenu stwarza słabo ujemne regiony na dwóch dalszych wierzchołkach wyobrażonego czworościanu

STRUKTURA WODY

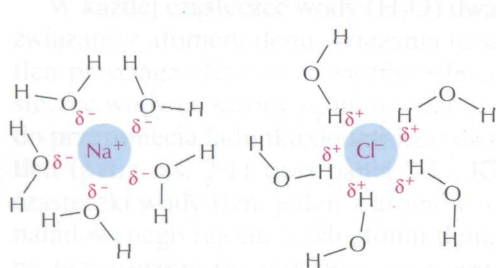
Cząsteczki wody przejściowo łączą się tworząc wodorowo związaną sieć przestrzenną. Nawet w 37°C 15% cząsteczek wody jest połączonych z czterema innymi w krótkotrwały układ określany jako kompleks migotliwy



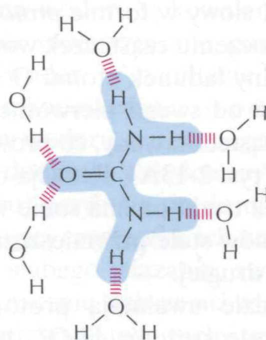
Wiele niezwykłych właściwości wody, jak duże napięcie powierzchniowe, *ciepło właściwe i ciepło parowania*, wynika z kohezyjnego charakteru wody

CZĄSTECZKI HYDROFILOWE

Substancje łatwo rozpuszczające się w wodzie nazywamy hydrofilowymi. Są one złożone z jonów lub polarnych cząsteczek, które przyciągają cząsteczki wody wskutek ładunku elektrycznego. Cząsteczki wody otaczają każdy jon lub polarną cząsteczkę znajdujące się na powierzchni stałej substancji i przenoszą je do roztworu



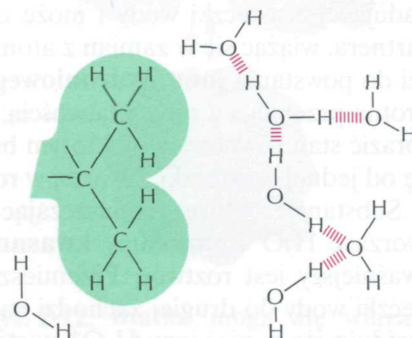
Substancje jonowe, takie jak chlorek sodowy, łatwo rozpuszczają się w wodzie, ponieważ cząsteczki wody są przyciągane przez dodatni (Na^+) lub ujemny (Cl^-) ładunek każdego z jonów



Substancje polarne, takie jak mocznik, rozpuszczają się, ponieważ ich cząsteczki tworzą wiązania wodorowe z otaczającymi je cząsteczkami wody

CZĄSTECZKI HYDROFOBOWE

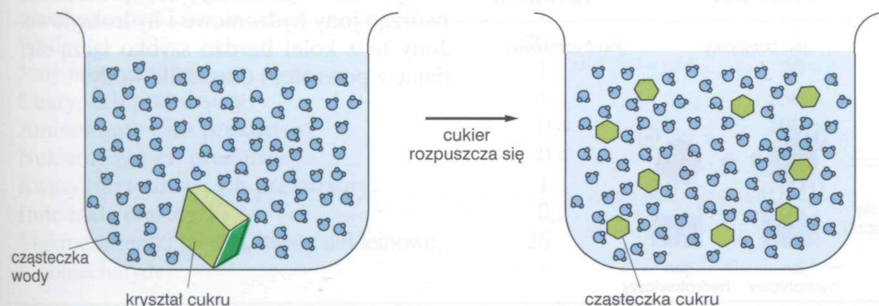
Cząsteczki zawierające większość wiązań niepolarnych zwykle są nierozpuszczalne w wodzie i są nazywane hydrofobowymi. Dotyczy to szczególnie węglowodorów, które zawierają wiele wiązań C—H. Takie cząsteczki nie przyciągają cząsteczek wody i wykazują małą tendencję do otaczania się nimi i przechodzenia do roztworu



Panel 2-2. Chemiczne właściwości wody i ich wpływ na biocząsteczki

WODA JAKO ROZPUSZCZALNIK

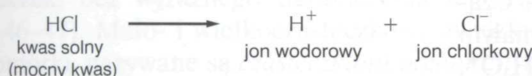
Wiele substancji, takich jak sacharoza (cukier spożywczy) rozpuszcza się w wodzie. Oznacza to, że ich cząsteczki oddzielają się od siebie i zostają otoczone cząsteczkami wody



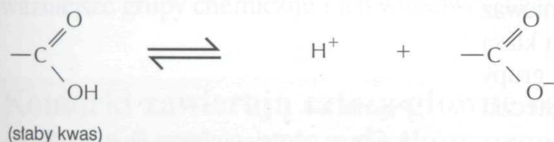
Po rozpuszczeniu się jakiejś substancji w cieczy tworzy się mieszanina zwana roztworem. Ciecz (w tym wypadku woda), w której rozpuszcza się substancja, nazywa się rozpuszczalnikiem. Woda dzięki polarności cząsteczek jest doskonałym rozpuszczalnikiem wielu substancji

KWASY

Substancje, które uwalniają w wodnym roztworze jony wodorowe, nazywamy kwasami



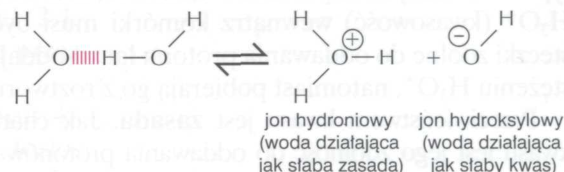
Wiele kwasów ważnych dla komórki ulega tylko częściowej dysocjacji i dlatego są to słabe kwasy, na przykład kwas octowy, którego część grup karboksylowych (—COOH) ulega dysocjacji, dając w roztworze kation wodorowy i anion reszty kwasowej

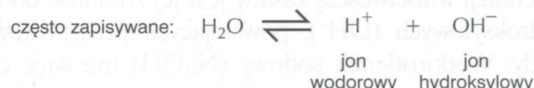


Zauważ, że jest to reakcja odwracalna

WYMIANA JONÓW WODOROWYCH

Dodatnio naładowane jony wodorowe (H^+) mogą spontanicznie przemieszczać się od jednej cząsteczki wody do drugiej, powodując w ten sposób powstawanie dwóch rodzajów jonów





Ponieważ proces ten szybko zachodzi w obu kierunkach, jony wodorowe bezustannie przemieszczają się pomiędzy cząsteczkami wody. Czysta woda zawiera statystycznie stałe stężenie jonów wodorowych i hydroksylowych (stężenie każdego z nich wynosi 10^{-7} mol /litr)

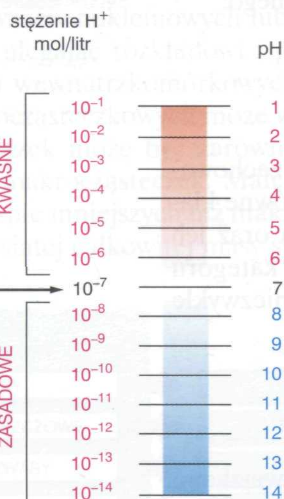
pH

Kwasowość roztworu jest zdefiniowana przez stężenie zawartych w nim jonów H^+. Dla wygody posługujemy się skalą pH, gdzie

$pH = -\log_{10}[H^+]$

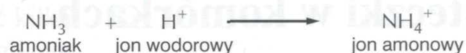
W czystej wodzie

$[H^+] = 10^{-7}$ mol/litr

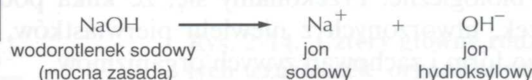


ZASADY

Substancje, które zmniejszają stężenie jonów wodorowych w roztworze, nazywamy zasadami. Niektóre zasady, takie jak amoniak, bezpośrednio wiążą jony wodorowe

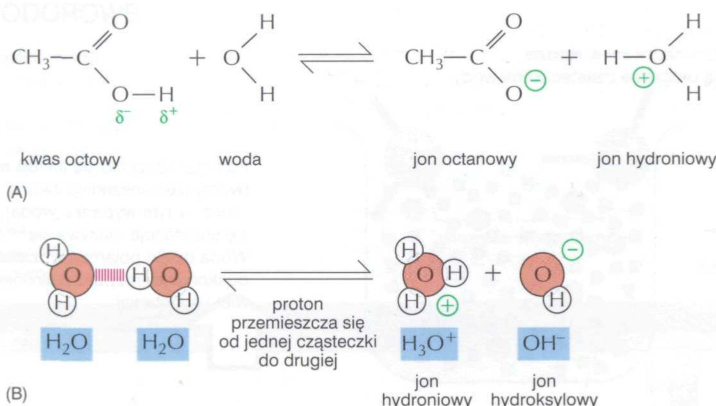


Inne zasady, takie jak wodorotlenek sodowy, zmniejszają liczbę jonów H^+ pośrednio, poprzez uwalnianie jonów OH^-, które z kolei bezpośrednio wiążą jony H^+ i tworzą H_2O



Wiele zasad występujących w komórkach ulega tylko częściowej dysocjacji; są to słabe zasady. Odnosi się to także do związków zawierających grupę aminową ($—NH_2$), wykazującą tendencję do odwracalnego wiązania jonów H^+ pochodzących z wody, co tym samym zwiększa ilość wolnych jonów OH^-





Rys. 2-13. Kwasy w wodzie. (A) Reakcja zachodząca po rozpuszczeniu się kwasu octowego w wodzie. (B) Cząsteczki wody stale wymieniają się protonami, tworząc jony hydroniowe i hydroksylowe. Jony te z kolei bardzo szybko łączą się, dając z powrotem cząsteczki wody

w wodnych roztworach występuje jako H_3O^+. Aby uniknąć stosowania niewygodnych liczb, stężenie H^+ przyjęto wyrażać w skali logarytmicznej, zwanej **skalą pH** (panel 2-2, s. 50–51). Czysta woda ma pH 7,0.

Ponieważ proton jonu hydroniowego może się łatwo przenosić na wiele typów rozmaitych cząsteczek w komórce, zmieniając ich charakter, stężenie H_3O^+ (kwasowość) wewnątrz komórki musi być ściśle regulowane. Cząsteczki zdolne do oddawania protonu łatwo oddają go w roztworze o małym stężeniu H_3O^+, natomiast pobierają go z roztworu o dużym stężeniu H_3O^+.

Przeciwieństwem kwasu jest **zasada**. Jak charakterystyczną właściwością kwasu jest jego zdolność do oddawania protonów (przez co wzrasta stężenie jonów H_3O^+ powstających po przyłączeniu protonu do cząsteczki wody), tak z definicji właściwością zasady jest jej zdolność do zwiększania stężenia jonów hydroksylowych (OH^-), powstających przez usunięcie protonu z cząsteczki wody. Wodorotlenek sodowy (NaOH) ma więc charakter zasady, ponieważ w wodnych roztworach dysocjuje z utworzeniem jonów Na^+ i OH^-. Inną klasą zasad, szczególnie ważną dla żywych komórek, są związki zawierające grupy $—NH_2$. Grupy te mogą tworzyć OH^- przez odciąganie protonu z cząsteczki wody:



$$—NH_2 + H_2O \rightleftarrows —NH_3^+ + OH^-.$$

Jon OH^- łączy się z jonem H_3O^+ dając dwie cząsteczki wody, w rezultacie więc wzrost stężenia OH^- wymusza zmniejszenie się stężenia H_3O^+ i na odwrót. Czysta woda wykazuje jednakowe małe stężenie (10^{-7}M) obu jonów; nie jest ani kwaśna, ani zasadowa i dlatego określa się ją jako obojętną, tj. mającą pH 7,0. Odczyn wewnątrz komórek jest zbliżony do obojętnego.

Pytanie 2-4.

A. Czy w czystej, obojętnej (tj. o pH = 7,0) wodzie znajdują się jony H_3O^+? Jeśli tak, to jak powstają?

B. Jeśli jony takie istnieją, jaki jest stosunek ilościowy jonów H_3O^+ do cząsteczek wody przy obojętnym pH? (Wskazówka: masa cząsteczkowa wody wynosi 18, a masa 1 litra wody — 1 kg).

Cząsteczki w komórkach

Po przeglądnięciu sposobów łączenia się atomów w cząsteczki i zachowania się cząsteczek w środowisku wodnym, omówimy obecnie główne klasy związków małocząsteczkowych występujących w komórkach oraz ich funkcje biologiczne. Przekonamy się, że kilka podstawowych kategorii cząsteczek, utworzonych z niewielu pierwiastków, zapewnia niezwykłe bogactwo form i zachowań żywych organizmów.

Komórkę tworzą związki węgla

Pomijając wodę, prawie wszystkie cząsteczki w komórkach są związkami węgla. Cechą wyróżniającą węgiel spośród innych pierwiastków jest jego zdolność do tworzenia wielkich cząsteczek; daleko za nim drugie miejsce

Tabela 2-3. Przybliżony skład chemiczny komórki bakteryjnej

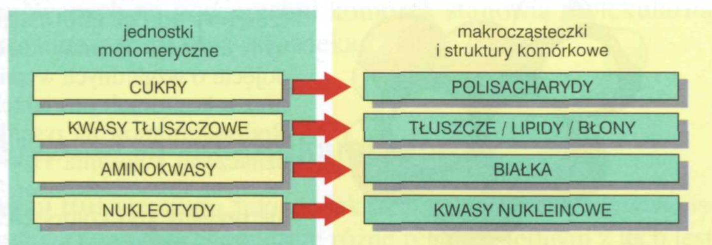
	Procent masy komórki	Liczba rodzajów cząsteczek
Woda	70	1
Jony nieorganiczne	1	20
Cukry i ich prekursory	1	250
Aminokwasy i ich prekursory	0,4	100
Nukleotydy i ich prekursory	0,4	100
Kwasy tłuszczowe i ich prekursory	1	50
Inne małe cząsteczki	0,2	~300
Makrocząsteczki (białka, kwasy nukleinowe, polisacharydy)	26	~3000

zajmuje pod tym względem krzem. Ponieważ atom węgla jest mały i w zewnętrznej powłoce zawiera cztery elektrony oraz cztery wolne miejsca dla elektronów, może z innymi atomami tworzyć cztery wiązania kowalencyjne. Co jednak najważniejsze, jeden atom węgla może łączyć się z innymi atomami węgla stabilnymi kowalencyjnymi wiązaniami C—C, tworząc łańcuchy i pierścienie. Prowadzi to do powstania wielkich, złożonych cząsteczek, bez wyraźnego ograniczenia ich wielkości (patrz panel 2-1, s. 46–47). Mało- i wielkocząsteczkowe związki węgla, wytwarzane przez komórki, nazywane są *cząsteczkami organicznymi*.

Pewne kombinacje atomów, takie jak grupa metylowa ($—CH_3$), hydroksylowa (—OH), karboksylowa (—COOH), karbonylowa (—C═O), fosforanowa ($—PO_3^{2-}$) lub aminowa ($—NH_2$), powtarzają się w różnych cząsteczkach organicznych. Każda z tych grup ma odmienne właściwości chemiczne, i fizyczne, a ich obecność w cząsteczce decyduje o jej właściwościach. Najważniejsze grupy chemiczne i ich właściwości zebrano w panelu 2-1.

Komórki zawierają cztery główne rodziny małocząsteczkowych związków organicznych

Małe cząsteczki organiczne występujące w komórce mają masę cząsteczkową od 100 do 1000 i zawierają do około 30 atomów węgla. Zwykle występują jako wolne cząsteczki w roztworze w cytoplazmie, a ich losy mogą być bardzo różne. Niektóre z nich są wykorzystywane jako jednostki *monomeryczne* do konstruowania gigantycznych polimerowych *makrocząsteczek* komórki — białek, kwasów nukleinowych lub polisacharydów. Inne służą jako źródło energii, ulegając rozkładowi i przekształceniu w inne małe cząsteczki w gąszczu wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych. Wiele związków małocząsteczkowych może w komórce pełnić kilka ról. Na przykład jakiś związek może być zarówno źródłem energii jak i elementem budulcowym makrocząsteczek. Małe cząsteczki organiczne występują w ilościach znacznie mniejszych niż makrocząsteczki i stanowią zaledwie około jednej dziesiątej całkowitej masy substancji organicznych



Rys. 2-14. Cztery główne rodziny małych cząsteczek organicznych w komórkach. Związki małocząsteczkowe stanowią elementy konstrukcyjne, lub inaczej jednostki monomeryczne, większości makrocząsteczek i struktur komórkowych. Niektóre z nich, na przykład cukry i kwasy tłuszczowe, są również źródłem energii

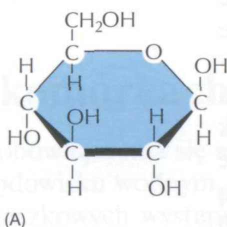
w komórkach (tab. 2-3). Według pobieżnego szacunku, w typowej komórce występuje około tysiąca rodzajów takich cząsteczek.

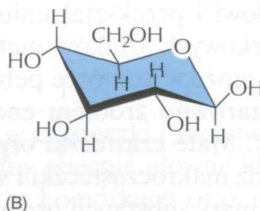
Wszystkie cząsteczki organiczne są syntetyzowane z jednakowego zestawu bardzo prostych związków i ulegają rozpadowi dając podobny ich zestaw. Zarówno synteza jak i rozpad cząsteczek organicznych zachodzi w serii następujących po sobie zmian chemicznych, ograniczonych co do zasięgu i przebiegających według określonych reguł. Toteż związki występujące w komórce wykazują chemiczne pokrewieństwo i mogą być zaklasyfikowane do niewielkiej liczby różnych rodzin. Ogólnie komórki zawierają cztery główne rodziny małocząsteczkowych związków organicznych: *cukry*, *kwasy tłuszczowe*, *aminokwasy* i *nukleotydy* (rys. 2-14). Chociaż wielu związków występujących w komórce nie można zaliczyć do żadnej z tych kategorii, wymienione cztery rodziny małocząsteczkowych związków organicznych oraz makrocząsteczki powstałe z ich łączenia się w długie łańcuchy stanowią przeważającą część masy komórek (patrz tab. 2-3).

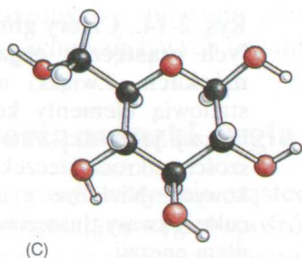
Pytanie 2-5. Dokładnie obejrzyj cząsteczkę glukozy przedstawioną na rysunku 2-15C i D za pomocą modeli kulkowego i czaszowego. Zauważ, że na obydwu ilustracjach znajdują się atomy wodoru o dwóch różnych wielkościach. Czy powinniśmy przeprosić Czytelników za ewentualny błąd popełniony przez rysownika? Uzasadnij odpowiedź.

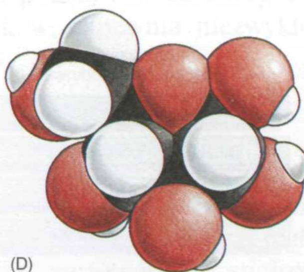
Cukry są dla komórek źródłem energii i stanowią podjednostki polisacharydów

Najprostsze **cukry** — *monosacharydy* są związkami o ogólnym wzorze $(CH_2O)_n$, gdzie n zwykle przybiera wartość 3, 4, 5, 6 lub 7. Cukry i cząsteczki z nich utworzone często nazywa się *węglowodanami* ze względu na ich wzór sumaryczny, w którym stosunek ilości węgla do pozostałych pierwiastków jest taki, jaki byłby po połączeniu się jednego atomu węgla z jedną cząsteczką wody. Glukoza ma wzór sumaryczny $C_6H_{12}O_6$ (rys. 2-15 i panel 2-3, s. 56–57); wzór ten jednak nie definiuje w pełni cząsteczki glukozy, gdyż ten sam zestaw atomów węgla, wodoru i tlenu może być kowalencyjnie połączony na wiele różnych sposobów, tworząc struktury o rozmaitych kształtach. Jak przedstawiono w panelu 2-3 (s. 56–57), glukoza może być przekształcona w inne cukry — mannozę lub galaktozę po prostu przez zmianę orientacji niektórych grup OH w stosunku do pozostałej części cząsteczki. Każdy z tych cukrów może ponadto istnieć w jednej z dwóch form — D lub L, z których każda jest lustrzanym odbiciem drugiej. Zestawy cząsteczek o tym samym wzorze sumarycznym, ale wykazujących odmienne struktury, nazywa się *izomerami*, a pary cząsteczek będących wzajemnym odbiciem lustrzanym — *izomerami optycznymi*. Wśród związków organicznych zjawisko izomerii występuje bardzo często, a w przypadku cukrów izomeria jest głównym czynnikiem decydującym o ich olbrzymiej różnorodności.









Rys. 2-15. Struktura cukru prostego — glukozy. Cząsteczkę tę można przedstawić kilkoma różnymi sposobami. We wzorach strukturalnych (A) i (B) atomy przedstawiono w postaci symboli chemicznych, połączonych *linią ciągłą*, oznaczającą wiązanie kowalencyjne. *Linii pogrubionych* użyto, aby przedstawić płaszczyznę pierścienia cukru oraz zaznaczyć, że grupy —H i —OH nie leżą w tej samej płaszczyźnie co pierścień. (B) Schemat trójwymiarowej struktury glukozy (podobną mają inne sześciowęglowe cukry proste). (C) Kulkowy model cząsteczki pokazujący przestrzenne ułożenie jej atomów. *Kolorowe kulki* — atomy, *pałeczki* — wiązania kowalencyjne. (D) Model czaszowy oprócz informacji o przestrzennym ułożeniu atomów daje także pewne pojęcie o względnych wymiarach atomów oraz o konturach powierzchni cząsteczki. Rodzaje atomów na rysunkach (C) i (D) oznaczono kolorami: H — *białym*, C — *czarnym*, O — *czerwonym*. Ten powszechnie przyjęty kod kolorystyczny będzie dalej stosowany w tym podręczniku

Cukry proste (monosacharydy) mogą łączyć się ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi, co prowadzi do tworzenia się większych węglowodanów. Dwa monosacharydy połączone ze sobą tworzą disacharyd, taki jak sacharoza zbudowana z reszt glukozy i fruktozy. Szeroka gama większych polimerów cukrowych sięga od *oligosacharydów* (trisacharydy, tetrasacharydy itd.) aż do gigantycznych *polisacharydów*, zawierających tysiące jednostek monosacharydowych. Przegląd struktur cukrów i ich właściwości chemicznych przedstawiono w panelu 2-3.

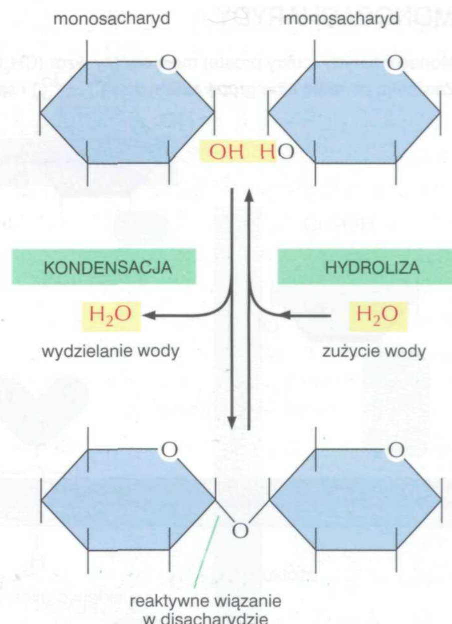
Sposób, w jaki cukry łączą się ze sobą, dobrze ilustruje ogólne cechy tworzenia się wiązań kowalencyjnych w procesach biochemicznych. Wiązanie tworzy się między grupą —OH jednego cukru i grupą —OH drugiego w reakcji **kondensacji**, w czasie której wydziela się cząsteczka wody (rys. 2-16). Jednostki monomeryczne w innych polimerach biologicznych, takich jak białka lub kwasy nukleinowe, także łączą się w reakcjach kondensacji, podczas których wydzielają się cząsteczki wody. Wiązania powstające podczas reakcji kondensacji mogą ulec zerwaniu w odwrotnym procesie **hydrolizy**, podczas którego zostaje zużyta cząsteczka wody (patrz rys. 2-16).

Ponieważ każdy cukier prosty ma kilka wolnych grup hydroksylowych zdolnych do tworzenia wiązań z innym monosacharydem (lub z niektórymi innymi związkami), polimery cukrowe mogą być rozgałęzione, a liczba możliwych struktur polisacharydów jest niezmiernie duża. Z tego też powodu zbadanie układu jednostek monomerycznych w polisacharydzie jest zadaniem znacznie bardziej złożonym niż określenie sekwencji nukleotydów w DNA, gdzie każda jednostka monomeryczna jest połączona z następną w dokładnie taki sam sposób.

Monosacharyd *glukoza* jest podstawowym źródłem energii dla komórek. W serii reakcji ulega ona rozpadowi do prostszych cząsteczek, przy czym uwalnia się energia w formie, w jakiej komórka może ją wykorzystać, co zostanie przedstawione w rozdz. 4. Proste polisacharydy, zbudowane wyłącznie z jednostek glukozowych — *glikogen* u zwierząt i *skrobia* u roślin (patrz panel 2-3, s. 56–57) są wykorzystywane przez komórki do magazynowania energii.

Cukry służą nie tylko do wytwarzania polimerów będących magazynami energii. Mogą też stanowić materiał budulcowy do konstruowania elementów struktury komórki. Związek organiczny występujący najobficiej na świecie — *celuloza*, z której są zbudowane ściany komórek roślinnych, — jest polisacharydem utworzonym z glukozy. Polisacharydem jest także inna obficie występująca substancja organiczna — *chityna*, stanowiąca materiał konstrukcyjny zewnętrznych szkieletów owadów oraz ścian komórkowych grzybów. Chityna jest liniowym polimerem pochodnej cukru, *N*-acetyloglukozaminy (patrz panel 2-3). Różne inne rodzaje polisacharydów są głównymi składnikami śluzów i chrząstki.

Mniejsze oligosacharydy mogą się kowalencyjnie łączyć z białkami tworząc glikoproteiny lub z lipidami tworząc *glikolipidy* (panel 2-4, s. 58–59), wchodzące w skład błon komórkowych. Powierzchnia większości komórek jest osłonięta i inkrustowana cukrowcowymi polimerami stanowiącymi składniki glikoprotein lub glikolipidów błony komórkowej. Często te boczne łańcuchy cukrowcowe stanowią miejsce wybiórczego rozpoznawania się komórek. Na przykład różnice w szczegółach budowy cukrów eksponowanych na powierzchni komórek stanowią molekularną podstawę rozróżniania grup krwi człowieka.



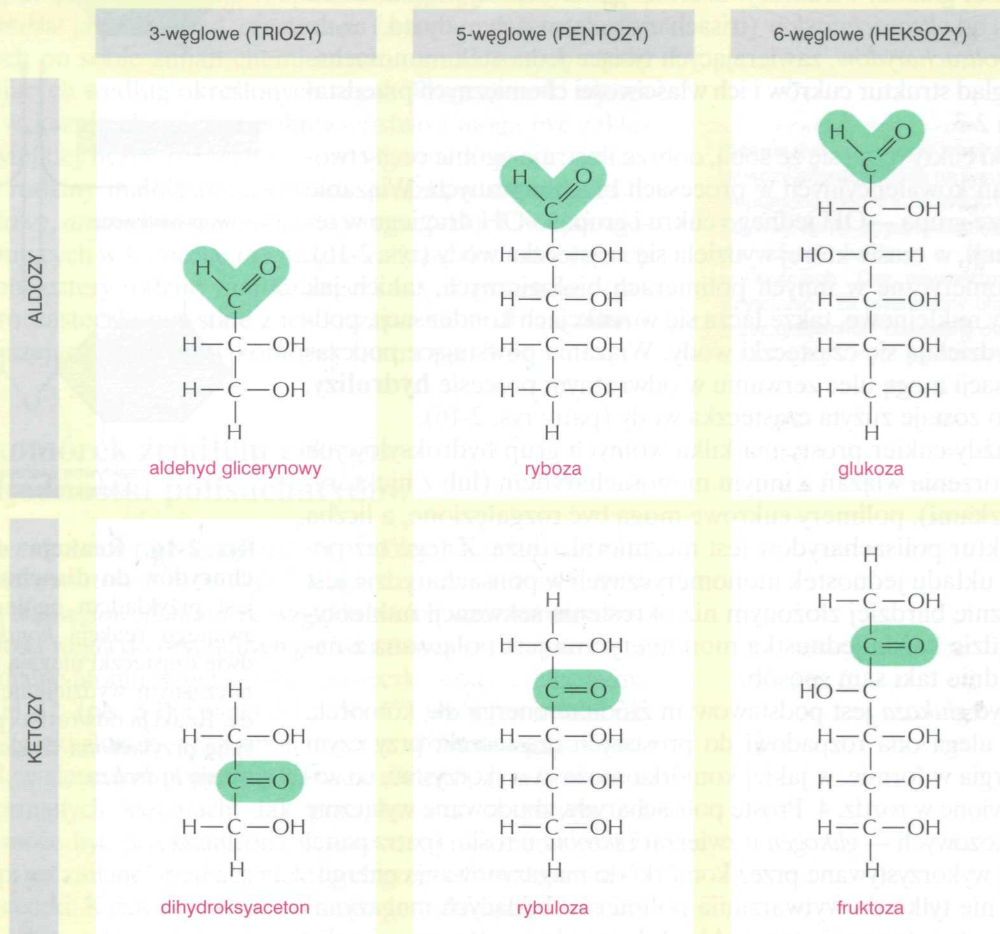
Rys. 2-16. Reakcja dwóch monosacharydów do disacharydu. Reakcja ta jest przykładem ogólnego typu reakcji, zwanego reakcją *kondensacji*, w której dwie cząsteczki ulegają połączeniu z równoczesnym wydzieleniem cząsteczki wody. Reakcja odwrotna (podczas której zostaje przyłączona cząsteczka wody) nazywa się *hydrolizą*

Kwasy tłuszczowe są składnikami błon

Cząsteczka **kwasu tłuszczowego**, takiego jak na przykład *kwas palmitynowy* (rys. 2-17 i panel 2-4), ma dwa chemicznie różne regiony. Jednym z nich jest

MONOSACHARYDY

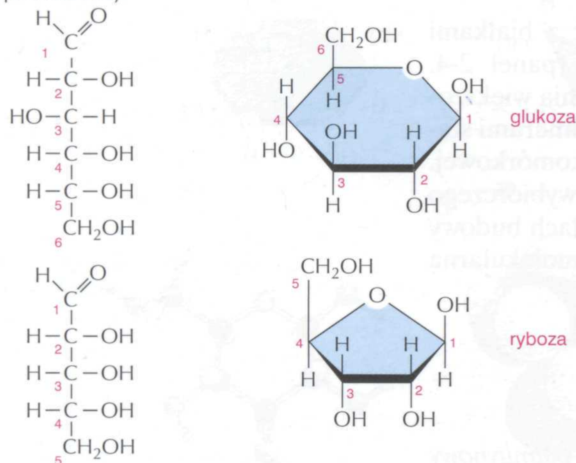
Monosacharydy (cukry proste) mają ogólny wzór $(CH_2O)_n$, gdzie *n* może przyjąć wartość 3, 4, 5, 6, 7 lub 8 i zawierają przynajmniej dwie grupy hydroksylowe. Zawierają ponadto albo grupę aldehydową ($-C\overset{O}{\leqslant}_H$) i są nazywane aldozami, albo grupę ketonową ($>C=O$) i są nazywane ketozami





CYKLIZACJA

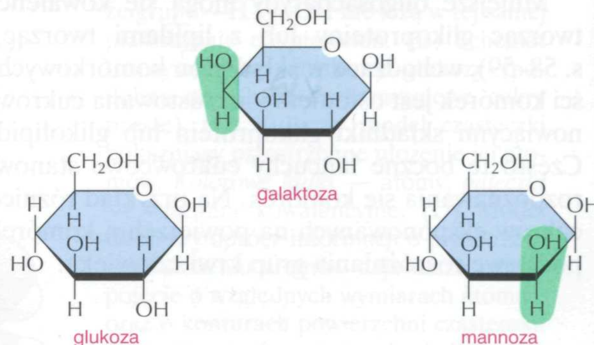
W wodnych roztworach grupa aldehydowa lub ketonowa cząsteczki cukru ma tendencję do łączenia się z grupą hydroksylową tej samej cząsteczki, co powoduje jej cyklizację (powstaje wewnątrzcząsteczkowe wiązanie półacetalowe)



Zauważ, że każdy z atomów węgla ma swój numer

IZOMERY

Wiele monosacharydów różni się między sobą jedynie przestrzennym ułożeniem atomów – są to izomery. Na przykład glukoza, galaktoza i mannoza mają identyczny wzór sumaryczny ($C_6H_{12}O_6$), ale różnią się przestrzennym ułożeniem (konfiguracją) grup hydroksylowych i atomów wodoru przy jednym lub dwóch atomach węgla

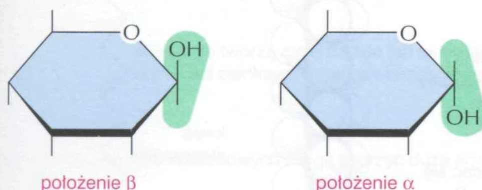


Te niewielkie różnice konfiguracji mają jedynie znikomy wpływ na właściwości chemiczne cukrów. Enzymy lub inne białka rozpoznają jednak te różnice i dlatego ich efekty biologiczne są całkiem wyraźne

 Panel 2-3. Przegląd niektórych rodzajów cukrów, powszechnie występujących w komórkach

KONFIGURACJA α LUB β

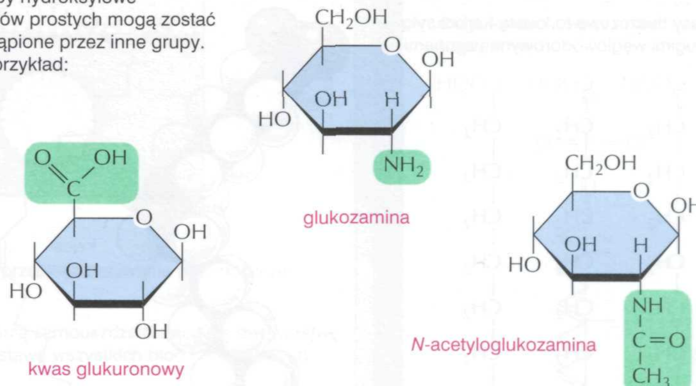
Grupa hydroksylowa przy węglu karbonylowym (aldehydowym lub ketonowym) może bardzo szybko przechodzić z jednego położenia w drugie. Położenia te (konfiguracje) określa się jako α lub β



Kiedy jakiś cukier połączy się z innym, jego konfiguracja α lub β ulega stabilizacji („zamrożeniu")

POCHODNE CUKRÓW

Grupy hydroksylowe cukrów prostych mogą zostać zastąpione przez inne grupy. Na przykład:

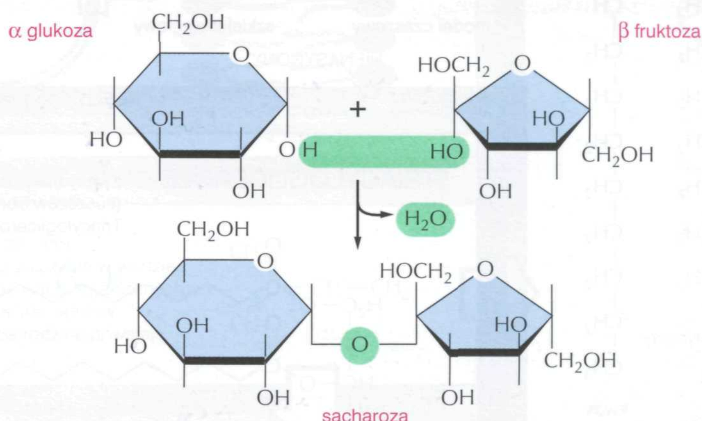


DISACHARYDY

Węgiel aldehydowy lub ketonowy jednej cząsteczki może reagować z jakąkolwiek grupą hydroksylową drugiej cząsteczki cukru, tworząc disacharyd. Powszechnie występującymi disacharydami są:

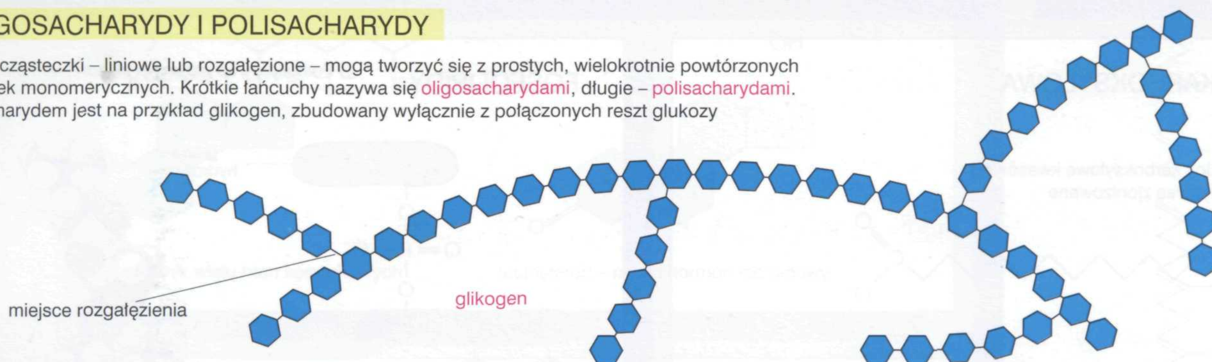
maltoza (glukoza + glukoza),
laktoza (galaktoza + glukoza),
sacharoza (glukoza + fruktoza)

Reakcję powstawania sacharozy przedstawiono obok



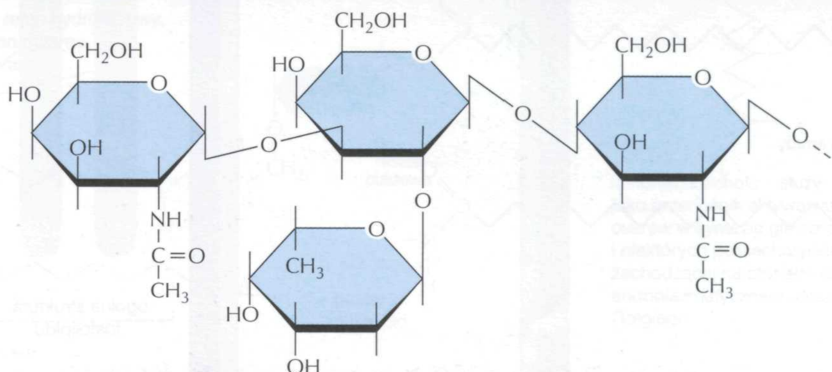
OLIGOSACHARYDY I POLISACHARYDY

Wielkie cząsteczki – liniowe lub rozgałęzione – mogą tworzyć się z prostych, wielokrotnie powtórzonych jednostek monomerycznych. Krótkie łańcuchy nazywa się oligosacharydami, długie – polisacharydami. Polisacharydem jest na przykład glikogen, zbudowany wyłącznie z połączonych reszt glukozy



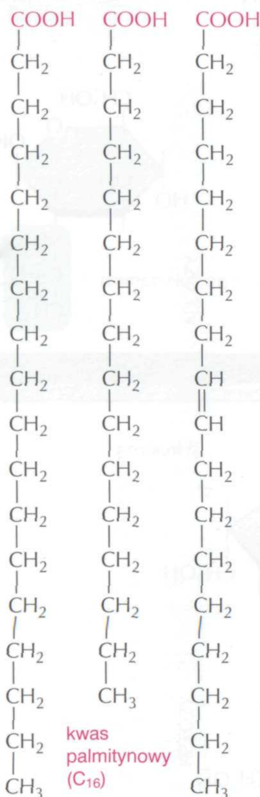
ZŁOŻONE OLIGOSACHARYDY

W wielu przypadkach sekwencja jednostek monomerycznych nie powtarza się, w skład oligosacharydu może wchodzić wiele różnych cząsteczek. Takie złożone oligosacharydy zwykle są połączone z białkami lub z lipidami. Na przykład oligosacharyd pokazany obok stanowi fragment cząsteczki eksponowanej na powierzchni komórek i określa poszczególne grupy krwi

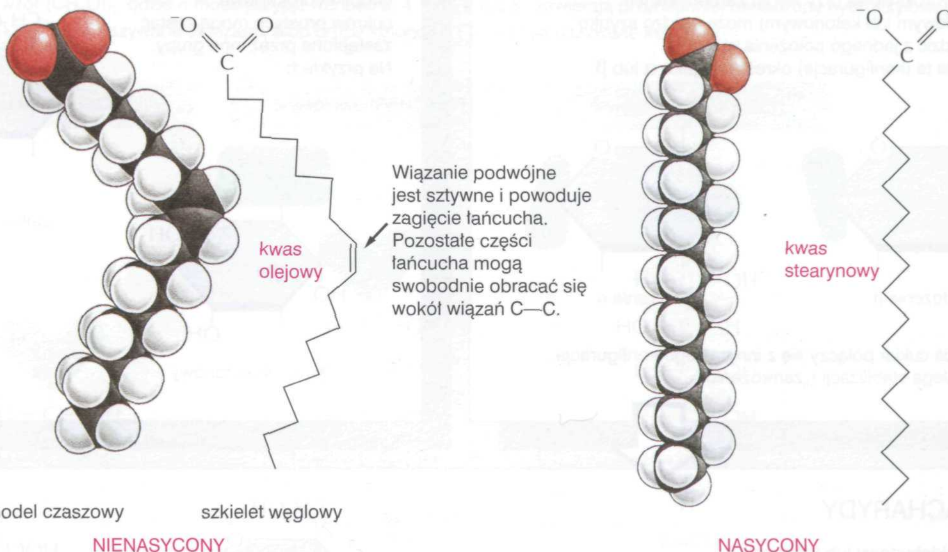


POWSZECHNIE WYSTĘPUJĄCE KWASY TŁUSZCZOWE

Kwasy tłuszczowe to kwasy karboksylowe z długimi węglowodorowymi „ogonami"

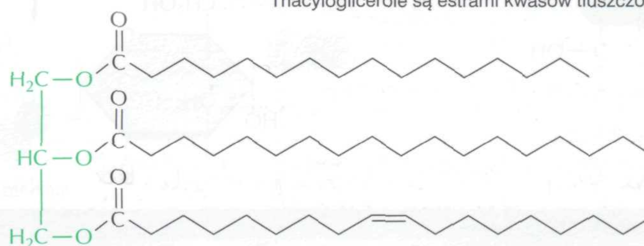


Istnieją setki różnego rodzaju kwasów tłuszczowych. Niektóre z nich – nienasycone – w łańcuchu węglowym zawierają wiązania podwójne. Nasycone kwasy tłuszczowe nie mają takich wiązań



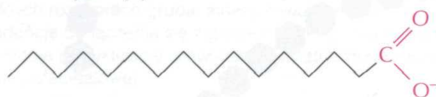
TRIACYLOGLICEROLE

Kwasy tłuszczowe, magazynowane w formie triacylogliceroli (*tłuszczów obojętnych*), *stanowią rezerwy energetyczne organizmu.* Triacyloglicerole są estrami kwasów tłuszczowych i glicerolu

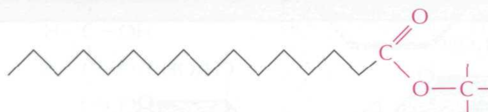


GRUPA KARBOKSYLOWA

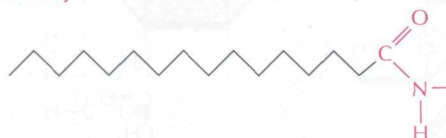
Wolne grupy karboksylowe kwasów tłuszczowych są zjonizowane



Najczęściej są one jednak połączone z innymi grupami, tworząc estry

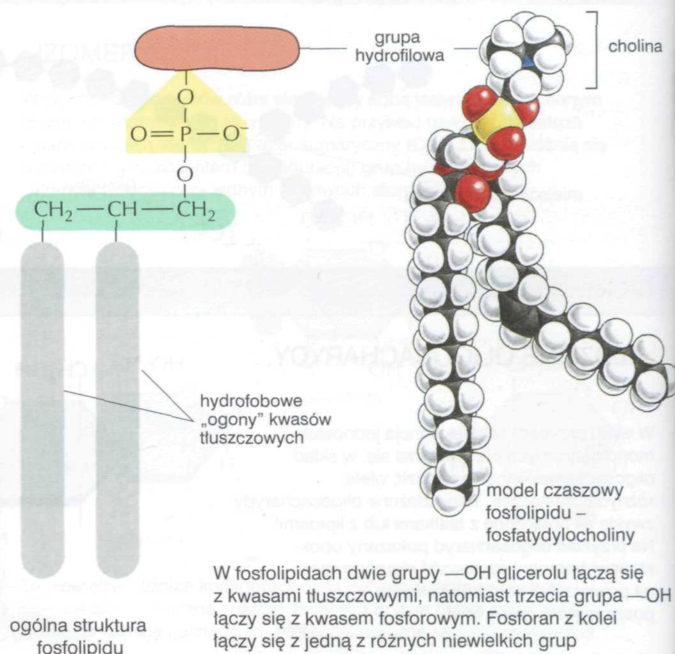


lub amidy



FOSFOLIPIDY

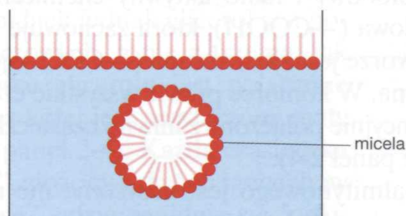
Fosfolipidy są głównym składnikiem błon



W fosfolipidach dwie grupy —OH glicerolu łączą się z kwasami tłuszczowymi, natomiast trzecia grupa —OH łączy się z kwasem fosforowym. Fosforan z kolei łączy się z jedną z różnych niewielkich grup polarnych, na przykład z grupą —OH jakiegoś alkoholu

AGREGATY LIPIDOWE

Kwasy tłuszczowe zawierają hydrofilową „głowę" i hydrofobowy „ogon"



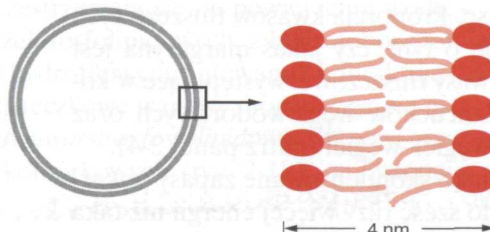
W wodzie tworzą małe micele lub układają się w postaci cienkiego filmu powierzchniowego

Pochodne kwasów tłuszczowych mogą tworzyć duże agregaty, utrzymywane przez oddziaływania hydrofobowe:

Triacyloglicerole w cytoplazmie komórek tworzą duże, kuliste kropelki tłuszczu

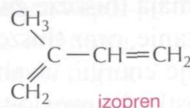


Fosfolipidy i glikopidy tworzą samouszczelniającą się dwuwarstwę lipidową, stanowiącą podstawę wszystkich błon komórkowych



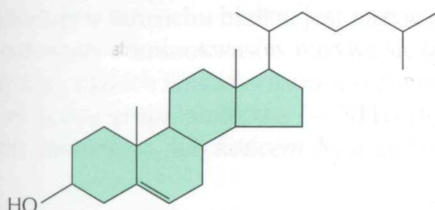
INNE LIPIDY

Lipidy ogólnie definiuje się jako zawarte w komórkach cząsteczki nierozpuszczalne w wodzie, ale rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. Dwoma innymi pospolitymi rodzajami lipidów są steroidy i poliizoprenoidy. Oba rodzaje powstają z jednostek izoprenowych

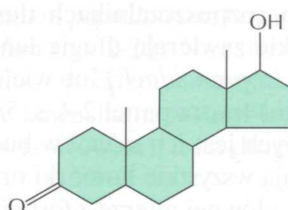


STEROIDY

Steroidy zawierają wspólny wielopierścieniowy element strukturalny



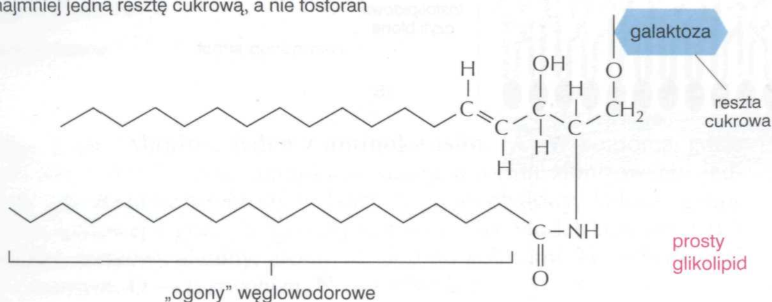
cholesterol – składnik wielu błon komórkowych



testosteron – męski hormon steroidowy

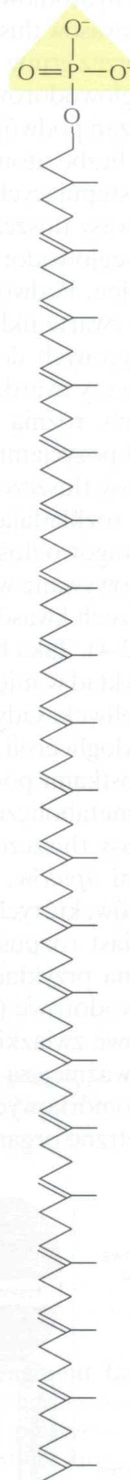
GLIKOLIPIDY

Podobnie jak fosfolipidy, cząsteczki glikolipidów zawierają rejon hydrofobowy, obejmujący dwa długie „ogony" węglowodorowe, oraz rejon polarny, zawierający przynajmniej jedną resztę cukrową, a nie fosforan



POLIIZOPRENOIDY

długi, łańcuchowy polimer izoprenowy



fosforan dolicholu – służy jako przenośnik aktywowanych cukrów w syntezie glikoprotein i niektórych polisacharydów, zachodzącej na błonach retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego

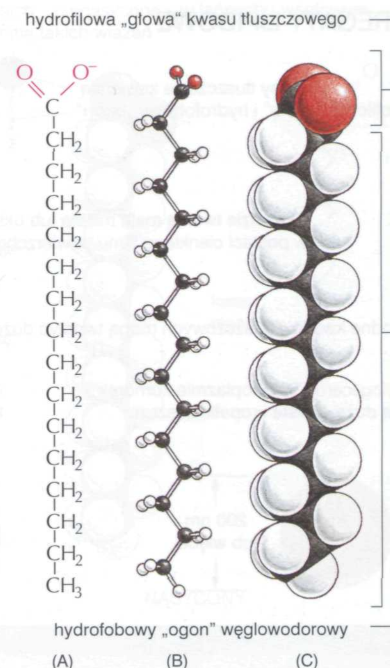
długi łańcuch węglowodorowy, hydrofobowy i mało aktywny chemicznie. Drugi region stanowi grupa karboksylowa (—COOH), która zachowuje się jak kwas (kwas karboksylowy): w roztworze jest zjonizowana (—COO^-), jest bardzo hydrofilowa, chemicznie aktywna. W komórce prawie wszystkie cząsteczki kwasów tłuszczowych są kowalencyjnie połączone z innymi cząsteczkami poprzez grupy karboksylowe (patrz panel 2-4).

Węglowodorowy „ogon" kwasu palmitynowego jest *nasycony*: nie ma on wiązań podwójnych między atomami węgla i zawiera największą z możliwych liczbę atomów wodoru. Kwas stearynowy, inny spośród powszechnie występujących w tłuszczu zwierzęcym, także jest nasycony. Niektóre inne kwasy tłuszczowe, takie jak kwas olejowy, zawierają *nienasycony* łańcuch węglowodorowy, w którym znajduje się co najmniej jedno wiązanie podwójne. Podwójne wiązania powodują załamania cząsteczek, co utrudnia ich zwarte układanie się w stałą masę. Proporcja kwasów tłuszczowych nienasyconych do nasyconych decyduje o tym, czy jakaś margaryna jest miękka czy twarda. Liczne i rozmaite kwasy tłuszczowe, występujące w komórkach, różnią się tylko długością łańcuchów węglowodorowych oraz liczbą i pozycjami podwójnych wiązań węgiel–węgiel (patrz panel 2-4).

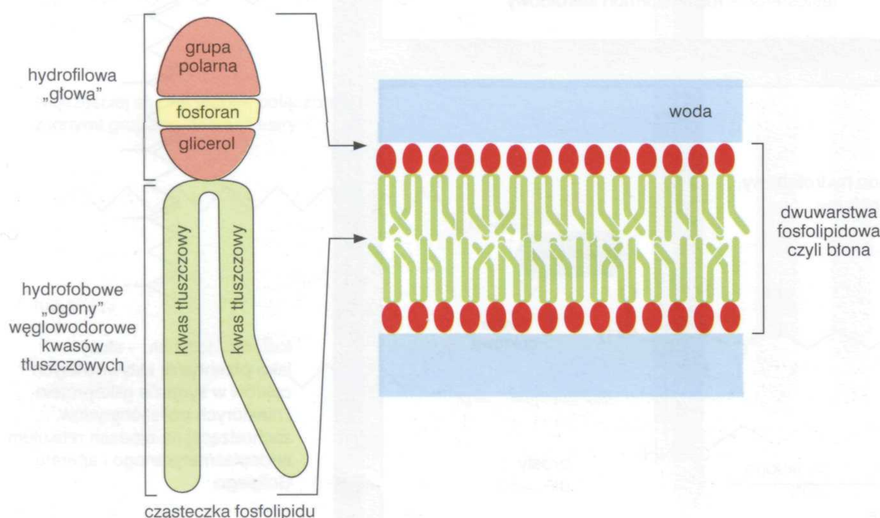
Kwasy tłuszczowe służą w komórce jako skondensowane zapasy pokarmowe: rozkładając się dostarczają około sześć razy więcej energii niż taka sama wagowo ilość glukozy. W cytoplazmie wielu różnych komórek są one przechowywane w formie kropli *triacylogliceroli*, których cząsteczka składa się z trzech kwasów tłuszczowych związanych z cząsteczką glicerolu (patrz panel 2-4). Taką budowę chemiczną mają tłuszcze zwierzęce, występujące na przykład w mięsie, maśle lub śmietanie, oraz tłuszcze roślinne, takie jak olej z oliwek. Gdy komórka potrzebuje energii, uwalnia kwasy tłuszczowe z triacylogliceroli i rozkłada na jednostki dwuwęglowe. Są one identyczne z jednostkami pochodzącymi z rozkładu glukozy i wchodzą w takie same szlaki metaboliczne dostarczające energii (patrz rozdz. 4).

Kwasy tłuszczowe i ich pochodne, takie jak triacyloglicerole, są przykładami *lipidów*. Ta klasa cząsteczek jest luźno zdefiniowaną kolekcją związków, których wspólną cechą jest to, że nie rozpuszczają się w wodzie, natomiast rozpuszczają się w organicznych rozpuszczalnikach tłuszczowych, na przykład w benzenie. Lipidy zwykle zawierają długie łańcuchy węglowodorowe (w kwasach tłuszczowych i *izoprenoidach*) lub wielopierścieniowe związki aromatyczne (w *steroidach*) (patrz panel 2-4, s. 58–59).

Najważniejszą funkcją kwasów tłuszczowych jest ich udział w budowie błon komórkowych. Te cienkie błony otaczają wszystkie komórki oraz ich wewnętrzne organelle. Są one zbudowane w głównej mierze z *fosfolipidów*



Rys. 2-17. Kwas tłuszczowy. Kwas tłuszczowy składa się z hydrofobowego łańcucha węglowodorowego, do którego jest dołączona hyrofilowa grupa karboksylowa. Rysunek przedstawia kwas palmitynowy. Kwasy tłuszczowe różnią się „ogonami" węglowodorowymi. (A) Wzór strukturalny. Grupa karboksylowa „głowy" pokazanego tutaj kwasu jest przedstawiona w formie zjonizowanej. (B) Model kulkowy. (C) Model czaszowy



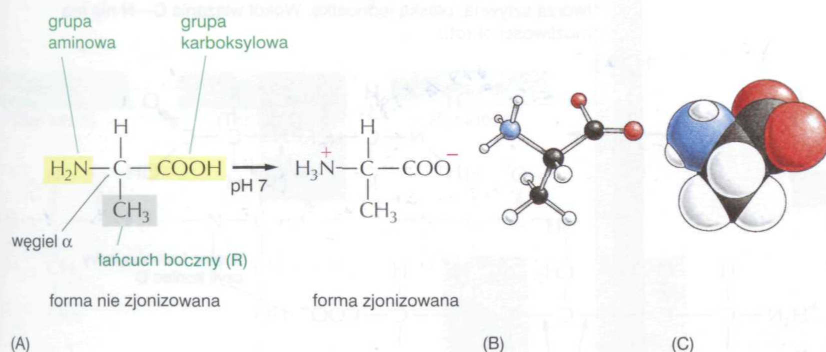
Rys. 2-18. Struktura fosfolipidu i ułożenie fosfolipidów w błonie. W środowisku wodnym hydrofobowe „ogony" węglowodorowe fospfolipidów grupują się razem, by uniknąć wody. Tworzą podwójną warstwę, w której hydrofilowa „głowa" każdego fosfolipidu jest skierowana ku wodzie

— małych cząsteczek, podobnie jak triacyloglicerole złożonych głównie z kwasów tłuszczowych i glicerolu. W fosfolipidach jednak glicerol jest połączony z dwoma łańcuchami kwasów tłuszczowych, a nie z trzema, jak w przypadku triacylogliceroli. Trzecie miejsce glicerolu jest połączone z hydrofilową resztą fosforanową, do której z kolei jest przyłączony mały związek hydrofilowy, taki jak cholina (patrz panel 2-4). Każda cząsteczka fosfolipidu zawiera więc hydrofobowy „ogon", złożony z dwóch łańcuchów kwasu tłuszczowego, oraz hydrofilową „głowę", gdzie znajduje się fosforan. Nadaje to im właściwości fizyczne i chemiczne inne niż triacyloglicerole, w których dominuje charakter hydrofobowy. Cząsteczki takie jak fosfolipidy, z regionami zarówno hydrofobowymi jak i hydrofilowymi, są nazywane cząsteczkami *amfipatycznymi*.

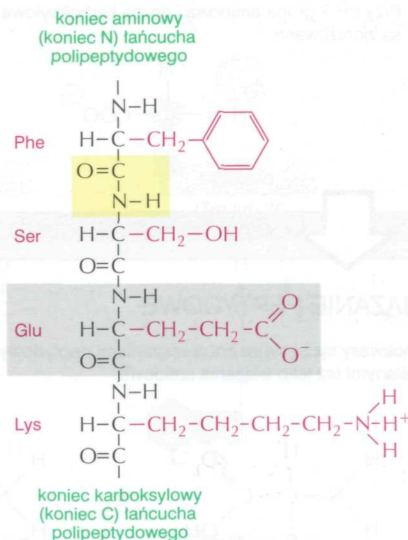
Zdolność fosfolipidów do tworzenia błon jest związana z ich amfipatycznym charakterem. Fosfolipidy rozprzestrzeniają się na powierzchni wody, tworząc pojedynczą warstwę cząsteczek fosfolipidowych, z hydrofobowymi „ogonami" skierowanymi ku górze, i hydrofilowymi „głowami" kontaktującymi się z wodą. Dwie takie jednocząsteczkowe warstwy mogą łączyć się na zasadzie „ogon z ogonem", tworząc *dwuwarstwę fosfolipidową*. Stanowi ona podstawę budowy wszystkich błon komórkowych (rys. 2-18), omówionej w rozdz. 11.

Aminokwasy są jednostkami monomerycznymi białek

Aminokwasy są klasą różnorodnych cząsteczek, ale mają następującą wspólną cechę: wszystkie zawierają grupę karboksylową oraz grupę aminową, obie połączone z tym samym atomem węgla, nazywanym węglem α (alfa), (rys. 2-19). Chemiczna różnorodność wynika z bocznych łańcuchów, również połączonych z węglem α. Aminokwasy odgrywają bardzo istotną rolę, gdyż w każdej komórce służą do wytwarzania **białek**, będących długimi łańcuchowymi polimerami aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi i pofałdowanymi w trzeciorzędową strukturę, unikatową dla każdego z typów białek. Wiązanie kowalencyjne między dwoma aminokwasami, które sąsiadują w łańcuchu białka, jest nazywane *wiązaniem peptydowym*; łańcuch zbudowany z aminokwasów nazywa się *polipeptydem* (rys. 2-20). Niezależnie od tego, z jakich aminokwasów jest zbudowany, każdy polipeptyd ma na jednym końcu grupę aminową (—NH_2) (ten koniec łańcucha nazywamy końcem aminowym, lub *końcem N*, a aminokwas, N-końcowym), a na drugim



Rys. 2-19. Alanina, jeden z aminokwasów. (A) W komórce, gdzie pH jest bliskie 7, wolny aminokwas istnieje w formie zjonizowanej, jednak gdy zostanie włączony w łańcuch polipeptydowy, ładunki grupy karboksylowej i grupy aminowej zanikają. (B) Model kulkowy i (C) model czaszowy alaniny; atomy oznaczono kolorami: H — *białym*, C — *czarnym*, O — *czerwonym*, N — *niebieskim*



Rys. 2-20. Krótki fragment łańcucha polipeptydowego. Przedstawiono cztery reszty aminokwasów połączone trzema wiązaniami peptydowymi, z których jedno na *żółtym* tle. Jeden z aminokwasów — na *szarym* tle. Łańcuchy boczne reszt aminokwasowych zaznaczono kolorem czerwonym. Dwa końce łańcucha polipeptydowego są chemicznie różne. Na jednym (końcu N, czyli aminowym) znajduje się grupa aminowa, na drugim (końcu C, czyli karboksylowym) — grupa karboksylowa

RODZINY AMINOKWASÓW

Powszechnie występujące aminokwasy dzielimy według charakteru łańcuchów bocznych, na:

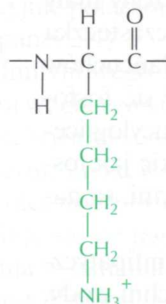
- kwaśne
- zasadowe
- polarne bez ładunku
- niepolarne

Aminokwasom białkowym nadano skrótowe nazwy trzyliterowe oraz skróty jednoliterowe

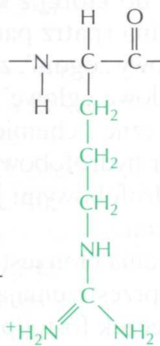
Na przykład: alanina = Ala = A

ZASADOWE ŁAŃCUCHY BOCZNE

lizyna (Lys lub K)

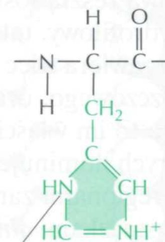


arginina (Arg lub R)



Ta grupa jest silnie zasadowa, gdyż jej dodatni ładunek jest stabilizowany przez rezonans

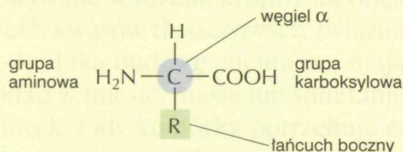
histydyna (His lub H)



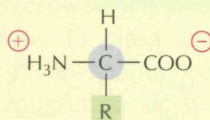
Te atomy azotu mają stosunkowo małe powinowactwo do H^+ i w obojętnym środowisku mają tylko częściowy ładunek dodatni

AMINOKWAS

Aminokwasy mają następujący ogólny wzór:

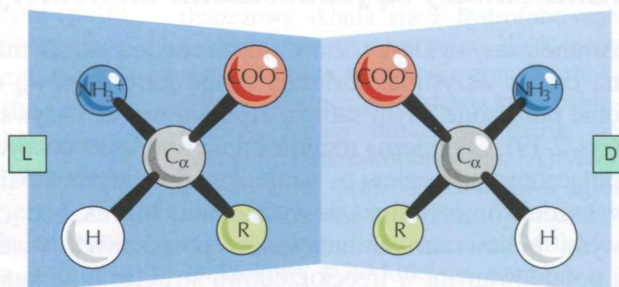


R może być jednym z 20 różnych łańcuchów bocznych. Przy pH 7 grupa aminowa i grupa karboksylowa są zjonizowane



IZOMERY OPTYCZNE

Atomy węgla α są asymetryczne, co powoduje występowanie dwóch izomerów optycznych (stereoizomerów) L i D, będących lustrzanymi odbiciami

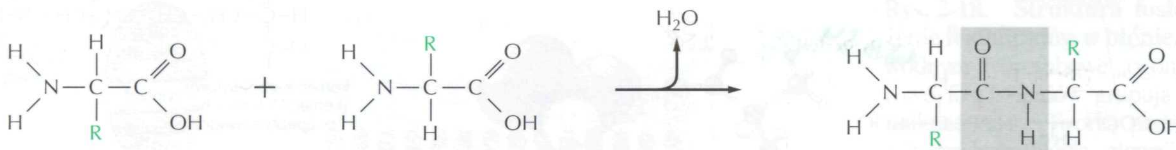


Białka są zbudowane wyłącznie z L-aminokwasów

WIĄZANIE PEPTYDOWE

Aminokwasy łączą się ze sobą wiązaniami peptydowymi, określanymi też jako wiązania amidowe

Wiązanie peptydowe: cztery atomy zaznaczone *szarymi prostokątami* tworzą sztywną, płaską jednostkę. Wokół wiązania C—N nie ma możliwości obrotu



Białka są długimi liniowymi polimerami aminokwasów, połączonych wiązaniami peptydowymi. Pokazany tutaj tripeptyd ma sekwencję: histydyna–cysteina–walina. Sekwencję aminokwasów w białkach i peptydach zapisujemy w ten sposób, by ich koniec aminowy znajdował się po lewej stronie

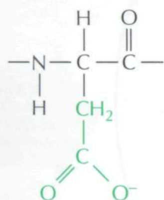


Wokół tych dwóch wiązań pojedynczych możliwy jest obrót, co nadaje długim łańcuchom zbudowanym z aminokwasów dużą elastyczność

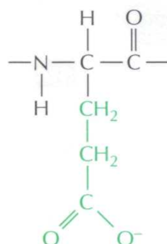
 Panel 2-5. W skład białek wchodzi 20 różnych aminokwasów

KWAŚNE ŁAŃCUCHY BOCZNE

kwas asparaginowy
(Asp lub D)

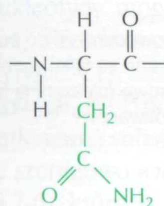


kwas glutaminowy
(Glu lub E)

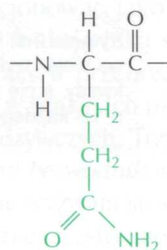


POLARNE ŁAŃCUCHY BOCZNE BEZ ŁADUNKU

asparagina
(Asn lub N)

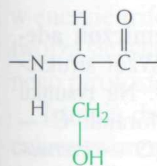


glutamina
(Gln lub Q)

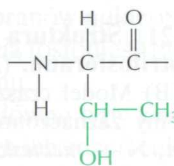


Grupa amidowa jest polarna, chociaż azot amidowy w obojętnym środowisku nie ma ładunku

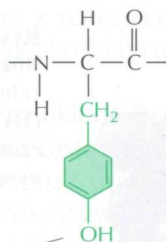
seryna
(Ser lub S)



treonina
(Thr lub T)



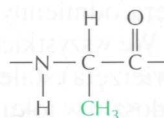
tyrozyna
(Tyr lub Y)



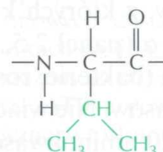
Grupa —OH jest polarna

NIEPOLARNE ŁAŃCUCHY BOCZNE

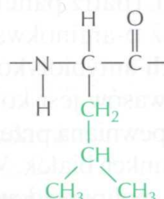
alanina
(Ala lub A)



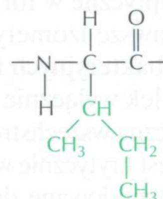
walina
(Val lub V)



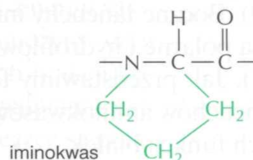
leucyna
(Leu lub L)



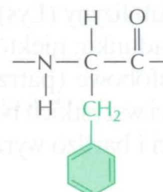
izoleucyna
(Ile lub I)



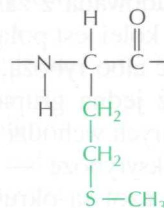
prolina
(Pro lub P)



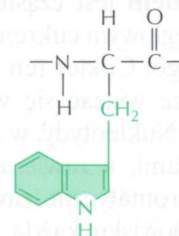
fenyloalanina
(Phe lub F)



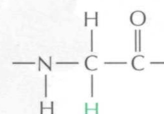
metionina
(Met lub M)



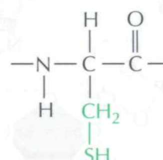
tryptofan
(Trp lub W)



glicyna
(Gly lub G)



cysteina
(Cys lub C)



Wiązanie disulfidowe (dwusiarczkowe) może powstać między bocznymi łańcuchami dwóch reszt cysteinowych w białkach



grupę karboksylową (—COOH) (ten koniec nazywamy końcem karboksylowym lub *końcem C*, a aminokwas C-końcowym). Nadaje to polipeptydom zdefiniowaną kierunkowość lub inaczej polarność strukturalną (nie mylić z polarnością elektryczną).

Powszechnie w białkach występuje dwadzieścia różnych rodzajów aminokwasów, z których każdy zawiera odmienny *łańcuch boczny* związany z węglem α (panel 2-5, s. 62–63). We wszystkich białkach, niezależnie od ich źródła (bakterie, rośliny lub zwierzęta) stale występuje tych samych 20 aminokwasów. Nie wiadomo, jak doszło w toku ewolucji do wyboru zestawu tych 20 aminokwasów. Stanowi to frapującą zagadkę życia, gdyż nie ma żadnych oczywistych chemicznych powodów, dla których inne aminokwasy nie mogłyby funkcjonować równie dobrze. Gdy jednak wybór raz został dokonany, nie mógł ulec zmianie; zbyt wiele od tego zależało.

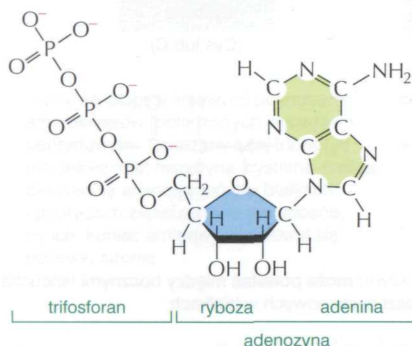
Aminokwasy, podobnie jak cukry, istnieją (z wyjątkiem glicyny) jako izomery optyczne w formie D lub L (patrz panel 2-5), ale w białkach znajdują się zawsze izomery L, chociaż D-aminokwasy wchodzą w skład ścian komórek bakteryjnych i niektórych antybiotyków. Wykorzystanie do produkcji białek wyłącznie L-aminokwasów jest kolejną zagadką ewolucji.

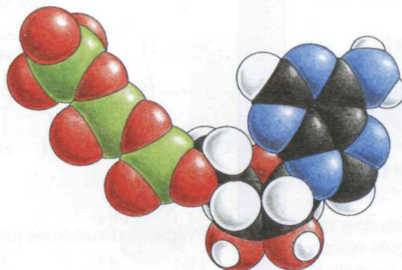
Chemiczna wszechstronność, zapewniana przez 20 standardowych aminokwasów, jest krytycznie ważna dla funkcji białek. Wszystkie wolne aminokwasy, tj. nie wbudowane do łańcucha polipeptydowego, mają grupę aminową i karboksylową, które w roztworze występują w formach zjonizowanych (patrz rys. 2-19). Pięć spośród dwudziestu aminokwasów zawiera boczne łańcuchy także zdolne do tworzenia w roztworze jonów, dzięki czemu łańcuchy te mogą być obdarzone ładunkiem, np. boczne łańcuchy kwasu glutaminowego (Glu) lub lizyny (Lys), (rys. 2-20). Boczne łańcuchy innych aminokwasów nie mają ładunku; niektóre z nich są polarne i hydrofilowe, inne są niepolarne i hydrofobowe (patrz panel 2-5). Jak przedstawimy to w rozdz. 5, suma właściwości wszystkich bocznych łańcuchów aminokwasów jest podstawą różnorodności i bardzo wyrafinowanych funkcji białek.

Pytanie 2-6. Co jest powodem, że do budowy białek wykorzystywane są tylko L-aminokwasy, a nie przypadkowa mieszanina form D- i L- każdego z aminokwasów?

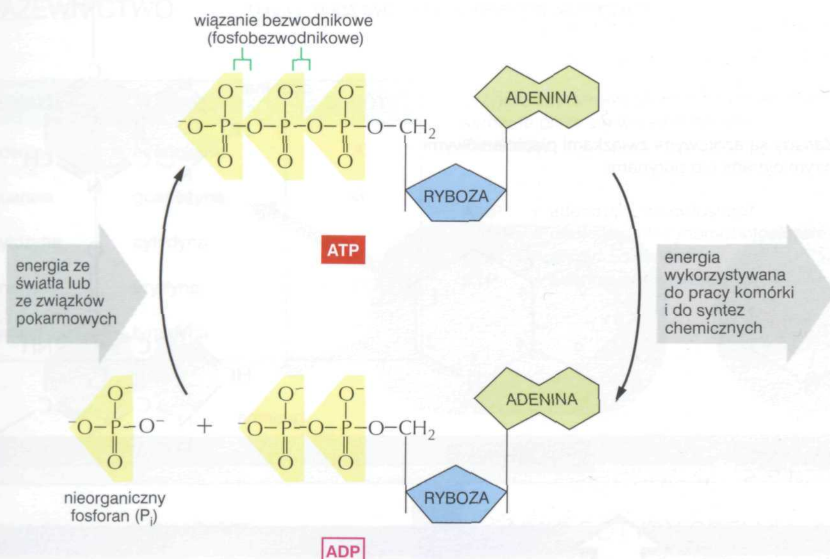
Nukleotydy są jednostkami monomerycznymi DNA i RNA

Nukleotydem jest cząsteczka zbudowana z zasady azotowej, połączonej z pięciowęglowym cukrem, który z kolei jest połączony z resztą kwasu ortofosforowego. Cukier ten może być albo rybozą, albo deoksyrybozą. Z cukrem może wiązać się więcej niż jedna grupa fosforanowa (panel 2-6, s. 66–67). Nukleotydy, w skład których wchodzi ryboza, nazywane są rybonukleotydami, a zawierające deoksyrybozę — deoksyrybonukleotydami. Związki aromatyczne zawierające azot są określane jako *zasady*; w kwaśnym środowisku każda z nich może wiązać H^+ (proton) i dzięki temu





Rys. 2-21. Struktura chemiczna adenozynotrifosforanu. (A) Wzór strukturalny. (B) Model czaszowy. Na rysunku (B) atomy zaznaczono kolorami: C — *czarnym*, N — *niebieskim*, O — *czerwonym*, P — *zielonym*



Rys. 2-22. Cząsteczka ATP w komórkach służy jako nośnik energii. Synteza ATP z ADP i nieorganicznego fosforanu wymaga nakładu energii. W komórkach zwierząt, drożdży i niektórych bakterii proces ten jest sprzężony z utlenianiem związków pokarmowych dostarczających energii. W komórkach roślin i niektórych bakterii jest sprzężony z pochłanianiem światła. Hydroliza ATP z powrotem do ADP i nieorganicznego fosforanu stanowi źródło energii potrzebnej do napędzania wielu reakcji zachodzących w komórce

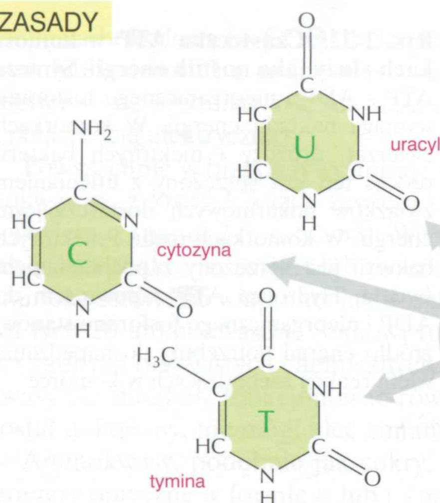
zwiększa stężenie jonów OH^- w roztworze. Pomiędzy różnymi zasadami istnieje duże rodzinne podobieństwo: *cytozyna (C)*, *tymina (T)* i *uracyl (U)* są nazywane *pirymidynami*, ponieważ stanowią pochodne sześcioczłonowego pierścienia pirymidynowego; *guanina (G)* i *adenina (A)* są *purynami*, zawierającymi pierścień pięcioczłonowy, zespolony z sześcioczłonowym. Nazwy nukleotydów pochodzą od zawartych w nich zasad (patrz panel 2-6).

Nukleotydy mogą funkcjonować jako krótkotrwałe nośniki energii chemicznej. Przede wszystkim funkcję taką spełnia trifosforan adenozyny, czyli ATP (rys. 2-21), uczestniczący w przenoszeniu energii w setkach reakcji komórkowych. ATP powstaje w reakcjach napędzanych energią uwalnianą podczas utleniania substancji odżywczych. Trzy fosforany w tej cząsteczce są połączone szeregowo *wiązaniami bezwodnikowymi* (*fosfobezwodnikowymi*) (patrz panel 2-6), których zerwanie wyzwala stosunkowo dużą ilość energii użytecznej dla komórki. Szczególnie często ulega hydrolitycznemu odszczepieniu końcowa grupa fosforanowa, czemu często towarzyszy przeniesienie tego fosforanu na inne cząsteczki i uwolnienie energii napędzającej reakcje syntezy zachodzące gdziekolwiek w komórce (rys. 2-22). Inne pochodne nukleotydów służą jako nośniki innych grup chemicznych, co przedstawiono w rozdz. 3.

Najbardziej podstawową funkcją nukleotydów w komórce jest jednak magazynowanie i przekazywanie informacji biologicznej. Nukleotydy służą jako elementy do konstruowania *kwasów nukleinowych* — długich polimerów, w których poszczególne jednostki nukleotydowe są kowalencyjnie połączone wiązaniami *fosfodiestrowymi* między resztą fosforanową związaną z cukrem jednego nukleotydu a grupą hydroksylową cukru następnego nukleotydu. Łańcuchy kwasów nukleinowych są syntetyzowane z bogatych w energię trifosforanów nukleozydów w reakcji kondensacji, w czasie której tworzą się wiązania fosfodiestrowe i dochodzi do uwalniania się nieorganicznego pirofosforanu.

Istnieją dwa główne typy kwasów nukleinowych, różniące się rodzajem cukru, tworzącego ich rdzeń cukrowo-fosforanowy: **kwasy rybonukleinowe** (**RNA**), których rdzeń zawiera *rybozę*, oraz **kwasy deoksyrybonukleinowe** (**DNA**), zawierające *deoksyrybozę* (w której hydroksyl w pozycji 2' pierścienia cukru został zastąpiony wodorem — patrz panel 2-6). W skład RNA wchodzą zasady A, G, C oraz U, w skład DNA — A, G, C oraz T (T jest chemicznie podobna do U) (rys. 2-23). RNA występuje w komórkach zwykle w postaci pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych, natomiast DNA prawie zawsze tworzy dwuniciową cząsteczkę, złożoną z dwóch łań-

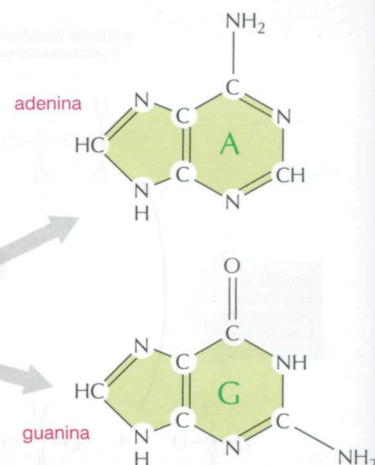
ZASADY



Zasady są azotowymi związkami pierścieniowymi – pirymidynami lub purynami

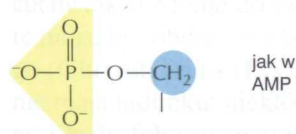
PIRYMIDYNA

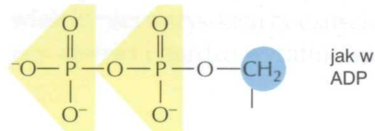
PURYNA

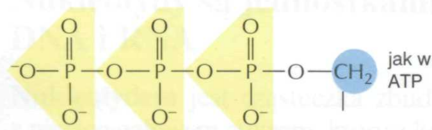


FOSFORANY

Fosforany normalnie są połączone z hydroksylem 5' reszty rybozy lub deoksyrybozy. Powszechnie występują mono-, di- i trifosforany







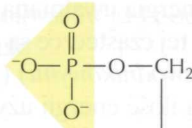
Fosforany nadają nukleotydom ładunek ujemny

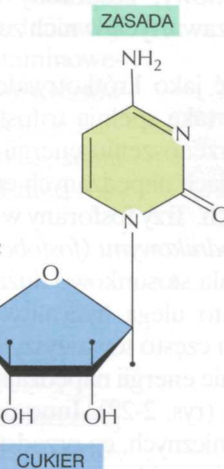
NUKLEOTYDY

Nukleotyd składa się z zasady azotowej, pięciowęglowego cukru i co najmniej jednej grupy fosforanowej

ZASADA

FOSFORAN



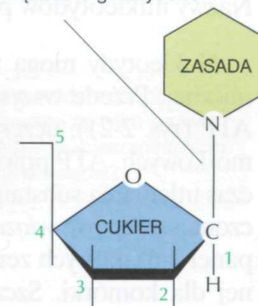


nukleotydy są jednostkami monomerycznymi kwasów nukleinowych

CUKIER

WIĄZANIE CUKIER – ZASADA

wiązanie *N*-glikozydowe

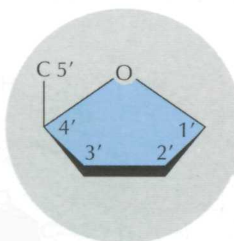


Zasada łączy się z tym samym węglem rybozy (C1), którym ryboza może łączyć się z innym cukrem

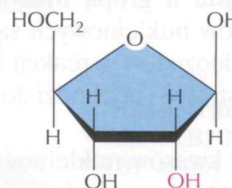
CUKRY

PENTOZA

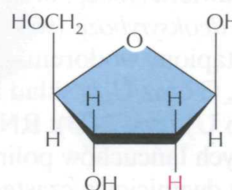
cukier pięciowęglowy



dwa rodzaje



β-D-ryboza występuje w kwasach rybonukleinowych



β-D-2-deoksyryboza występuje w kwasach deoksyrybonukleinowych

Atomy węgla cukru w nukleotydzie są numerowane kolejnymi liczbami ze znaczkiem „prim". Mówi się dlatego o węglu 5', 4' (czytaj: pięć prim, cztery prim)

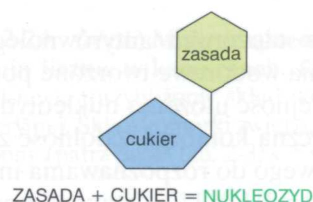
NAZEWNICTWO

Nazwy mogą być mylące, ale skróty są klarowne

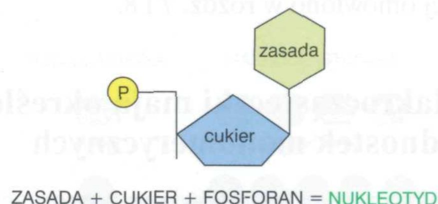
ZASADA	NUKLEOZYD	SKRÓT
adenina	adenozyna	A
guanina	guanozyna	G
cytozyna	cytydyna	C
uracyl	urydyna	U
tymina	tymidyna	T

przyjęto trzyliterowe skróty nazw nukleotydów; skróty te pisze się wielkimi literami. Przykłady:

AMP = adenozynomonofosforan
dAMP = deoksyadenozynomonofosforan
UDP = urydynodifosforan
ATP = adenozynotrifosforan



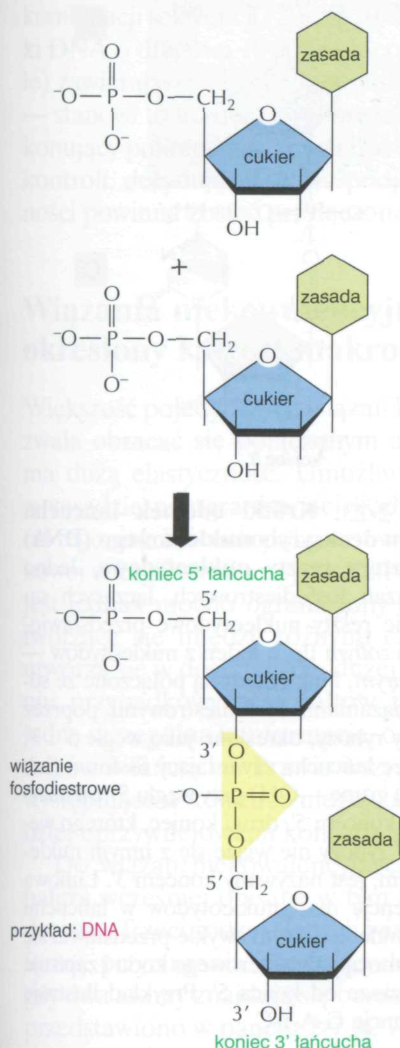
ZASADA + CUKIER = NUKLEOZYD



ZASADA + CUKIER + FOSFORAN = NUKLEOTYD

KWASY NUKLEINOWE

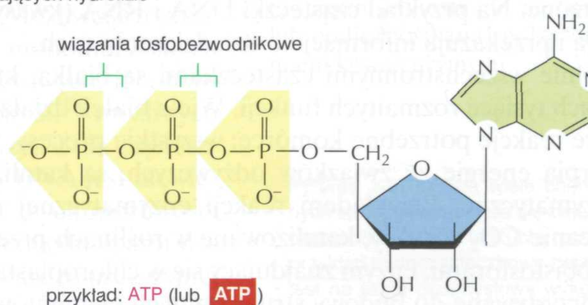
Kwasy nukleinowe powstają przez połączenie się nukleotydów wiązaniami fosfodiestrowymi w długie, liniowe łańcuchy. Wiązania fosfodiestrowe tworzą się między węglem 3' jednego nukleotydu a węglem 5' następnego. Kolejność nukleotydów w łańcuchu kwasu nukleinowego zapisuje się jednoliterowymi skrótami, zaczynając od końca 5' łańcucha, pisanego od lewej strony, na przykład A-G-C-T-T-A-C-A



przykład: DNA

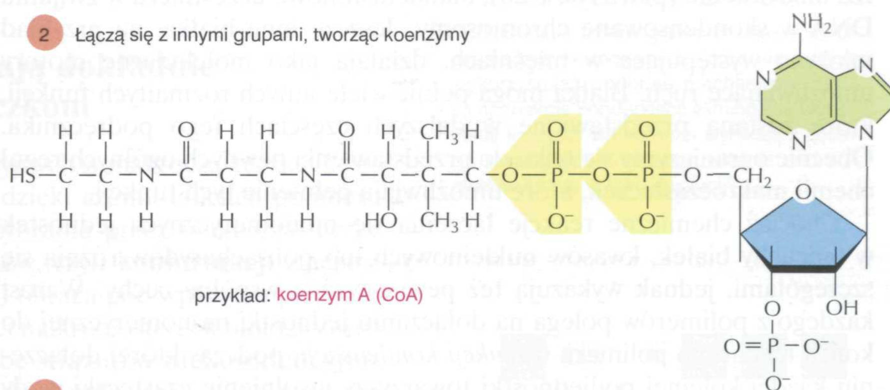
NUKLEOTYDY SPEŁNIAJĄ WIELE INNYCH FUNKCJI

1 Przenoszą energię chemiczną zawartą w wiązaniach fosfobezwodnikowych, łatwo ulegających hydrolizie



przykład: ATP (lub ATP)

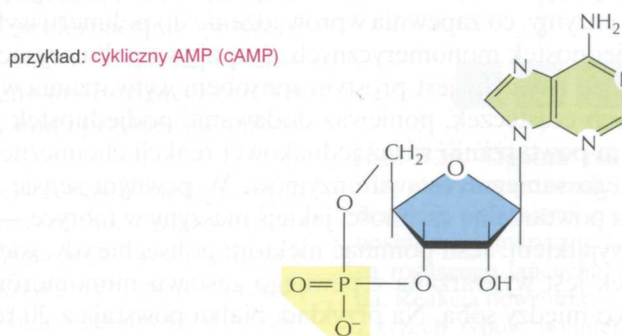
2 Łączą się z innymi grupami, tworząc koenzymy



przykład: koenzym A (CoA)

3 Funkcjonują w komórce jako specyficzne cząsteczki sygnałowe

przykład: cykliczny AMP (cAMP)



cuchów ułożonych antyrównolegle i utrzymywanych obok siebie przez wiązania wodorowe tworzone pomiędzy zasadami obu łańcuchów.

Kolejność ułożenia nukleotydów w DNA lub RNA koduje informację genetyczną komórki. Zdolność zasad w różnych cząsteczkach kwasu nukleinowego do rozpoznawania innych zasad i tworzenia z nimi par: G z C oraz A z T lub U — stanowi podstawę dziedziczności i ewolucji, co szerzej omówiono w rozdz. 7 i 8.

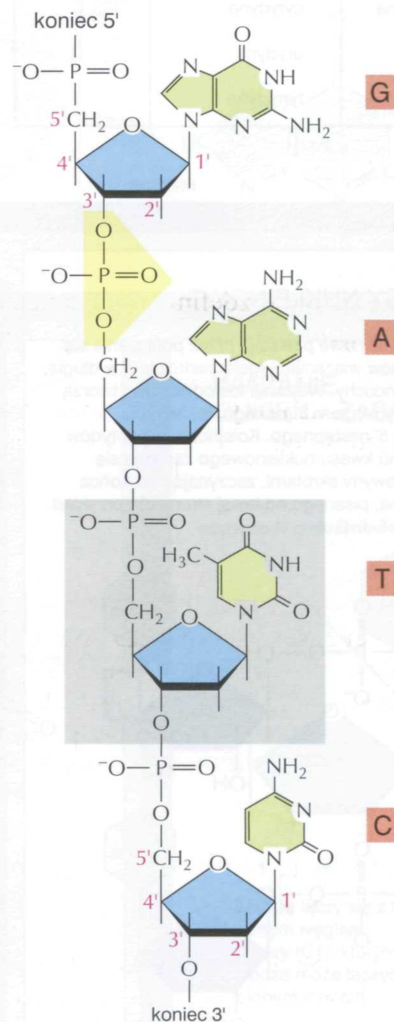
Pytanie 2-7. Co oznaczają określenia: *polarność* łańcucha polipeptydowego i *polarność* wiązania chemicznego? Czym różnią się te pojęcia?

Makrocząsteczki mają określoną sekwencję jednostek monomerycznych

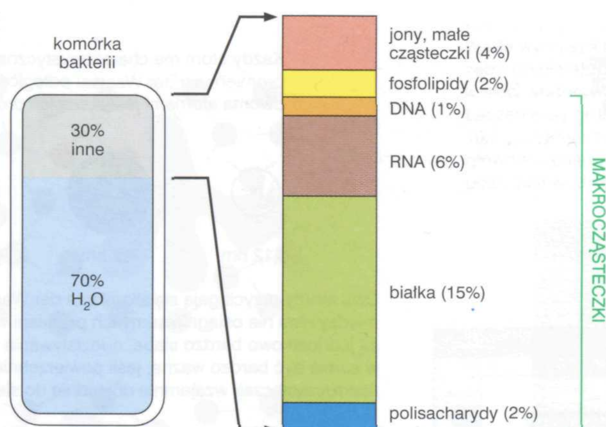
Makrocząsteczki stanowią w komórkach zdecydowanie najobficiej występującą grupę związków węgla (rys. 2-24). Są one podstawowym materiałem, z którego są skonstruowane komórki, oraz decydują o najistotniejszych cechach charakteryzujących istoty żywe. Makrocząsteczki w komórkach są polimerami powstającymi przez kowalencyjne połączenie się w długie łańcuchy małych cząsteczek organicznych (zwanych *monomerami* lub *podjednostkami*) (rys. 2-25). Wykazują one jednak wiele nieoczekiwanych właściwości, nie dających się przewidzieć na podstawie składników, z których zostały utworzone. Na przykład cząsteczki DNA i RNA (kwasy nukleinowe) magazynują i przekazują informacje o dziedziczeniu cech.

Szczególnie wszechstronnymi cząsteczkami są białka, które spełniają w komórkach tysiące rozmaitych funkcji. Wiele białek działa jako enzymy, katalizujące reakcje potrzebne komórce: wszystkie procesy, w których komórki czerpią energię ze związków odżywczych, są katalizowane przez białka enzymatyczne. Przykładem reakcji enzymatycznej może też być przekształcanie CO_2 w cukry, katalizowane w roślinach przez karboksylazę rybulozobisfosforanu, enzym znajdujący się w chloroplastach. Inne białka są wykorzystywane do budowy strukturalnych elementów komórki; na przykład tubulina jest białkiem, które w procesie samoorganizacji wytwarza mikrotubule (patrz rys. 1-20), białka histonowe uczestniczą w zwijaniu DNA w skondensowane chromosomy. Jeszcze inne białka, na przykład miozyna występująca w mięśniach, działają jako molekularne motory umożliwiające ruch. Białka mogą pełnić wiele innych rozmaitych funkcji, które zostaną przedstawione w dalszych częściach tego podręcznika. Obecnie ograniczymy się tylko do przedstawienia pewnych ogólnych reguł chemii makrocząsteczek, które umożliwiają pełnienie tych funkcji.

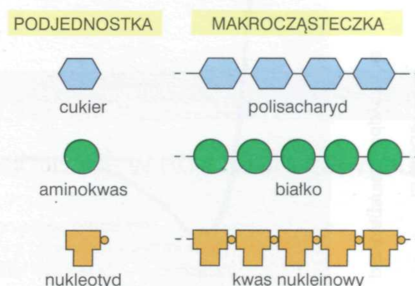
Chociaż chemiczne reakcje łączenia się monomerycznych jednostek w łańcuchy białek, kwasów nukleinowych lub polisacharydów różnią się szczegółami, jednak wykazują też pewne ważne wspólne cechy. Wzrost każdego z polimerów polega na dołączaniu jednostki monomerycznej do końca rosnącego polimeru w *reakcji kondensacji*, podczas której dołączeniu każdej kolejnej podjednostki towarzyszy uwolnienie cząsteczki wody (rys. 2-26, patrz też rys. 2-16). We wszystkich przypadkach reakcje są katalizowane przez enzymy, co zapewnia wprowadzenie do polimeru wyłącznie odpowiednich jednostek monomerycznych. Stopniowa polimeryzacja monomerów w długie łańcuchy jest prostym sposobem wytwarzania wielkich skomplikowanych cząsteczek, ponieważ dodawanie podjednostek polega na wielokrotnym powtarzaniu wciąż jednakowej reakcji chemicznej z wykorzystaniem tego samego zestawu enzymów. W pewnym sensie proces ten przypomina powtarzalne czynności jakiejś maszyny w fabryce — z jednym istotnym wyjątkiem. Jeśli pominąć niektóre polisacharydy, większość makrocząsteczek jest wytwarzana z pewnego zestawu monomerów, różniących się nieco między sobą. Na przykład, białka powstają z 20 różnych aminokwasów (patrz panel 2-5, s. 62–63). Co jednak najważniejsze, łańcu-



Rys. 2-23. Krótki odcinek łańcucha kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) — cztery reszty nukleotydowe. Jedno z wiązań fosfodiestrowych, łączących sąsiednie reszty nukleotydowe przedstawiono na *żółtym* tle, a jeden z nukleotydów — na *szarym*. Nukleotydy są połączone ze sobą wiązaniami fosfodiestrowymi poprzez atomy rybozy, określane jako węgle 5' i 3'. Koniec łańcucha zawierający fosforan (lub wolną grupę —OH) przy węglu 5' jest nazywany końcem 5', drugi koniec, którego węgiel 3' rybozy nie wiąże się z innym nukleotydem, jest nazywany końcem 3'. Liniową sekwencję reszt nukleotydów w łańcuchu polinukleotydowym zwykle przedstawia się za pomocą jednoliterowego kodu i zapisuje się zawsze od końca 5'. Przykład ilustruje sekwencję G-A-T-C



Rys. 2-24. (*obok*) **Makrocząsteczki występują licznie w komórkach.** Rysunek przedstawia przybliżony skład komórki bakteryjnej. Skład komórki zwierzęcej jest podobny (patrz także tab. 2-3, s. 53)

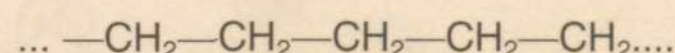


Rys. 2-25. Trzy rodziny makrocząsteczek. Każda makrocząsteczka jest polimerem utworzonym z małych cząsteczek (zwanych jednostkami monomerycznymi lub podjednostkami) połączonych wiązaniami kowalencyjnymi

chy polimerowe nie powstają drogą losowego wiązania monomerów, lecz są one łączone w zdefiniowanej kolejności, czyli **sekwencji**.

Mechanizmy decydujące o sekwencji polimerów przedstawiono w rozdz. 6 i 7. Mechanizmy te stanowią centrum biologii, ponieważ funkcje białek, kwasów nukleinowych i wielu polisacharydów całkowicie zależą od sekwencji ich jednostek monomerycznych w liniowym łańcuchu. Możliwość rozmaitego ułożenia kolejności (tj. sekwencji) jednostek monomerycznych stwarza niezwykle dużą różnorodność cząsteczek polimerowych. Dla białkowych łańcuchów złożonych z 200 aminokwasów istnieje 20^{200} możliwych kombinacji sekwencji (20·20·20·20..... pomnożone 200 razy), a dla cząsteczki DNA o długości 10 000 nukleotydów (co na standardy DNA jest niewiele) zawierającej cztery różne nukleotydy istnieje $4^{10\,000}$ różnych możliwości — stanowi to liczbę niewyobrażalnie wielką. Z tego też względu aparat dokonujący polimeryzacji musi być w komórkach poddany bardzo precyzyjnej kontroli, decydującej, która podjednostka monomeryczna i w jakiej kolejności powinna zostać przyłączona do rosnącego polimeru.

Pytanie 2-8. Istnieje wiele chemicznie różnych sposobów łączenia się związków małocząsteczkowych w łańcuchy polimerów. Na przykład małocząsteczkowy związek — eten jest na skalę przemysłową wykorzystywany do produkcji tworzywa sztucznego — polietylenu:

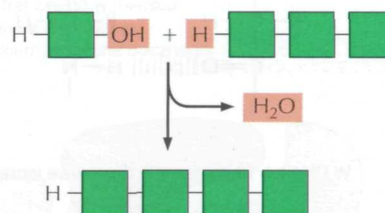

$$... —CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2....$$

Podjednostki trzech głównych klas makrocząsteczek biologicznych łączą się jednak wykorzystując podobne mechanizmy reakcji, tj. reakcje kondensacji eliminujące wodę. Jakie korzyści dla komórki wynikają z takiego rozwiązania i dlaczego właśnie ono zostało wybrane w toku ewolucji?

Wiązania niekowalencyjne nadają dokładnie określony kształt makrocząsteczkom

Większość pojedynczych wiązań kowalencyjnych w makrocząsteczkach pozwala obracać się połączonym atomom, dzięki czemu łańcuch polimeru ma dużą elastyczność. Umożliwia to przybranie przez makrocząsteczkę w zasadzie nieograniczonej liczby kształtów, czyli **konformacji** zależnie od tego, jak łańcuch polimeru wygina się i obraca pod wpływem przypadkowej energii termicznej. Kształt większości makrocząsteczek biologicznych jest jednak mocno ograniczony przez słabe **wiązania niekowalencyjne**, tworzące się między różnymi częściami cząsteczki. Jeśli takie wiązania utworzą się w dostatecznie dużej liczbie, to przeciwdziałają one powstawaniu przypadkowych kształtów i polimer może preferencyjnie przybrać jedną szczególną konformację, o której decyduje liniowa sekwencja monomerów w łańcuchu. Prawie wszystkie białka i liczne małe cząsteczki RNA występujące w komórce ulegają ścisłemu upakowaniu i przybierają najbardziej uprzywilejowaną konformację (rys. 2-27).

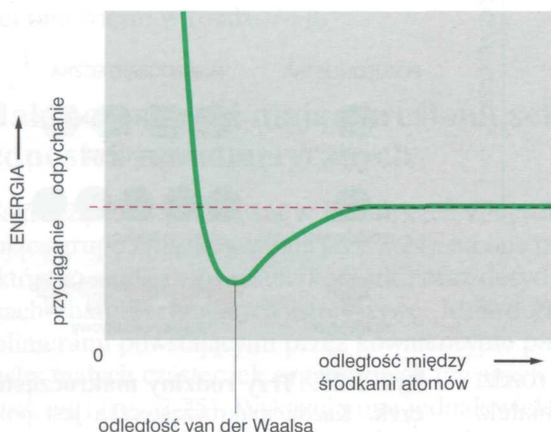
Do wiązań niekowalencyjnych ważnych w cząsteczkach biologicznych należą wcześniej opisane w tym rozdziale wiązania jonowe i wiązania wodorowe. Trzeci rodzaj słabych wiązań wynika z *sił van der Waalsa*, będących formą przyciągania oscylujących ładunków elektrycznych, powstających, gdy dwa atomy znajdują się bardzo blisko siebie. Niekowalencyjne wiązania przedstawiono w panelu 2-7 (s. 70–71).



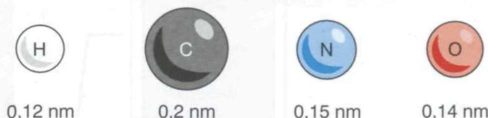
Rys. 2-26. Ogólna reakcja uzyskiwania makrocząsteczek. W reakcji kondensacji, polegającej na dołączaniu jednostek monomerycznych do jednego końca rosnącego łańcucha, wydziela się woda. Reakcja odwrotna — rozkład każdego z trzech typów polimerów — zachodzi przez dołączenie wody (hydrolizę)

SIŁY VAN DER WAALSA

Między dwoma atomami znajdującymi się bardzo blisko siebie powstają słabe oddziaływania wiążące, wynikające z fluktuacji ich ładunków elektrycznych. Jednak po zbytnim zbliżeniu się, między atomami działają duże siły odpychajace



Każdy atom ma charakterystyczną „wielkość" lub promień van der Waalsa: odległość kontaktowa między dwoma atomami jest sumą ich promieni van der Waalsa

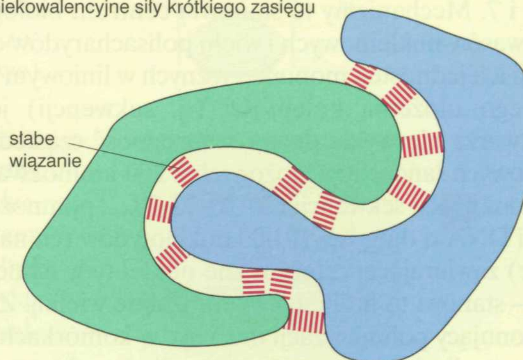


0,12 nm 0,2 nm 0,15 nm 0,14 nm

Dwa atomy przyciągają się siłami van der Waalsa, dopóki odległość między nimi nie osiągnie sumy ich promieni van der Waalsa. Chociaż siły te są jednostkowo bardzo słabe, oddziaływania van der Waalsa mogą w sumie być bardzo ważne, jeśli powierzchnie dwóch oddziałujących makrocząsteczek wzajemnie dokładnie do siebie pasują

SŁABE WIĄZANIA CHEMICZNE

Cząsteczki organiczne mogą oddziaływać z innymi cząsteczkami poprzez niekowalencyjne siły krótkiego zasięgu



Słabe wiązania chemiczne są co najmniej 20 razy słabsze niż silne wiązania kowalencyjne. Jeśli jednak tworzy się równocześnie duża liczba słabych wiązań, to umożliwiają one silne oddziaływania między dwiema cząsteczkami

WIĄZANIA WODOROWE

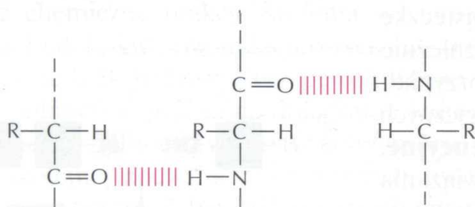
Jak już wcześniej opisano dla wody (patrz panel 2-2, s. 50 – 51) wiązania wodorowe powstają wtedy, gdy atom wodoru znajduje się między dwoma atomami o dużym powinowactwie do elektronów (zwykle tlenu i azotu)

Wiązania wodorowe są najsilniejsze wtedy, gdy zaangażowane w nich atomy leżą na jednej prostej :

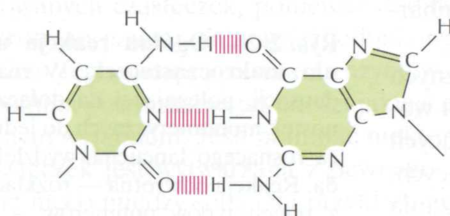


Przykłady w makrocząsteczkach:

W łańcuchach polipeptydowych reszty aminokwasowe są zaangażowane w tworzenie licznych wiązań wodorowych

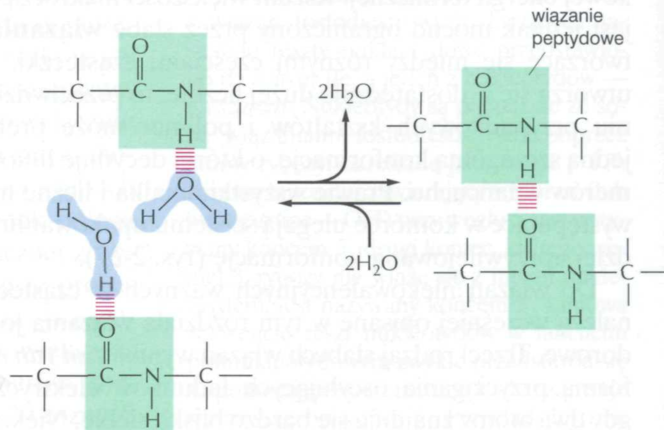


W DNA lub RNA wiązania wodorowe łączą dwie zasady, np. G z C



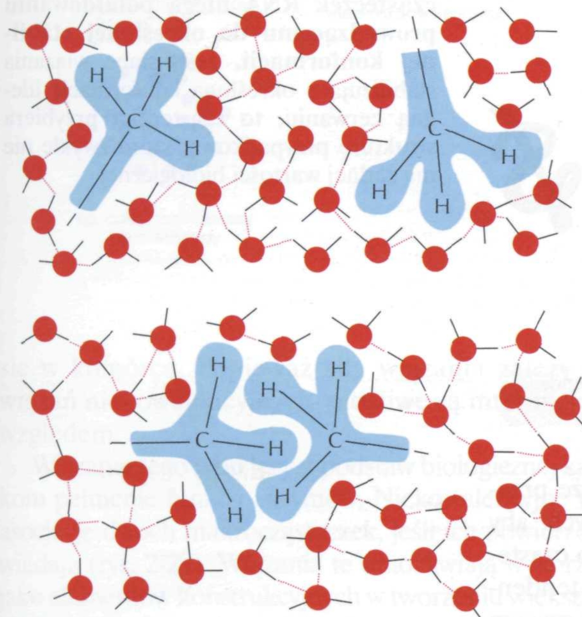
WIĄZANIA WODOROWE W WODZIE

Jakiekolwiek cząsteczki zdolne do tworzenia ze sobą wiązań wodorowych mogą też tworzyć takie wiązania z cząsteczkami wody. Ze względu na konkurencję ze strony cząsteczek wody, wiązania wodorowe między cząsteczkami rozpuszczonymi w wodzie są stosunkowo słabe



 Panel 2-7. Podstawowe rodzaje słabych wiązań niekowalencyjnych, którymi łączą się makrocząsteczki

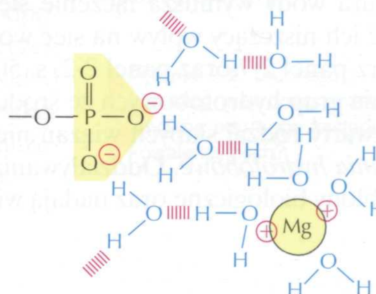
SIŁY HYDROFOBOWE



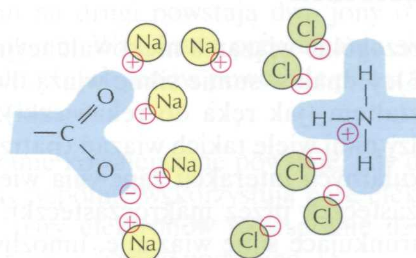
Woda wymusza łączenie się grup hydrofobowych, żeby zminimalizować zrywanie przez nie wiązań wodorowych w sieci wodorowo związanych cząsteczek wody. Łączenie się grup hydrofobowych jest czasami określane jako „wiązanie hydrofobowe" chociaż zjawisko to polega głównie na usuwaniu cząsteczek hydrofobowych poza fazę wodną

WIĄZANIA JONOWE W ROZTWORACH WODNYCH

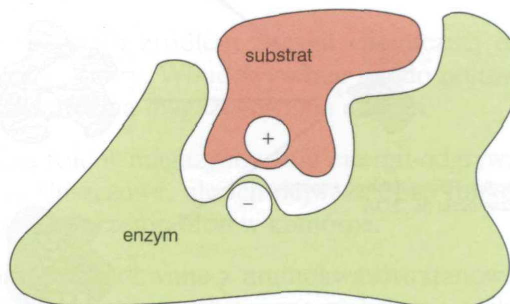
Naładowane grupy są otoczone oddziałującymi z nimi cząsteczkami wody. Dlatego wiązania jonowe są w środowisku wodnym słabe



W roztworze wodnym wokół naładowanej grupy mogą skupiać się także inne jony, podobnie jak cząsteczki wody, co prowadzi do dalszego osłabienia wiązań jonowych

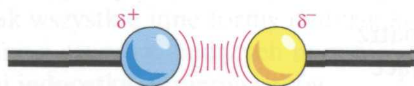


Pomimo osłabiania przez wodę i przez sole, w układach biologicznych wiązania jonowe są bardzo ważne. Enzym wiążący dodatnio naładowany substrat często w miejscu jego wiązania zawiera aminokwas z ujemnym ładunkiem łańcucha bocznego



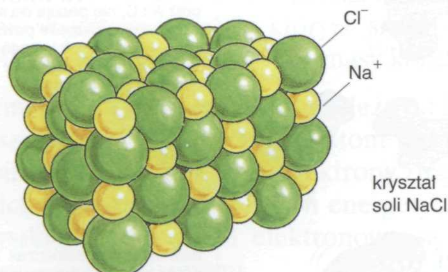
WIĄZANIA JONOWE

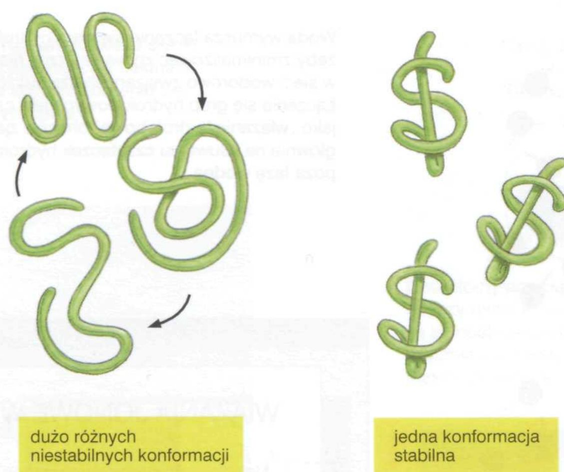
Oddziaływania jonowe zachodzą pomiędzy grupami mającymi całkowity (wiązanie jonowe) albo cząstkowy ładunek elektryczny



Siła przyciągania pomiędzy dwoma ładunkami, δ^+ i δ^-, szybko maleje ze wzrostem odległości pomiędzy ładunkami.

W nieobecności wody siły jonowe są bardzo duże. Są one odpowiedzialne za twardość takich minerałów jak marmur i agat





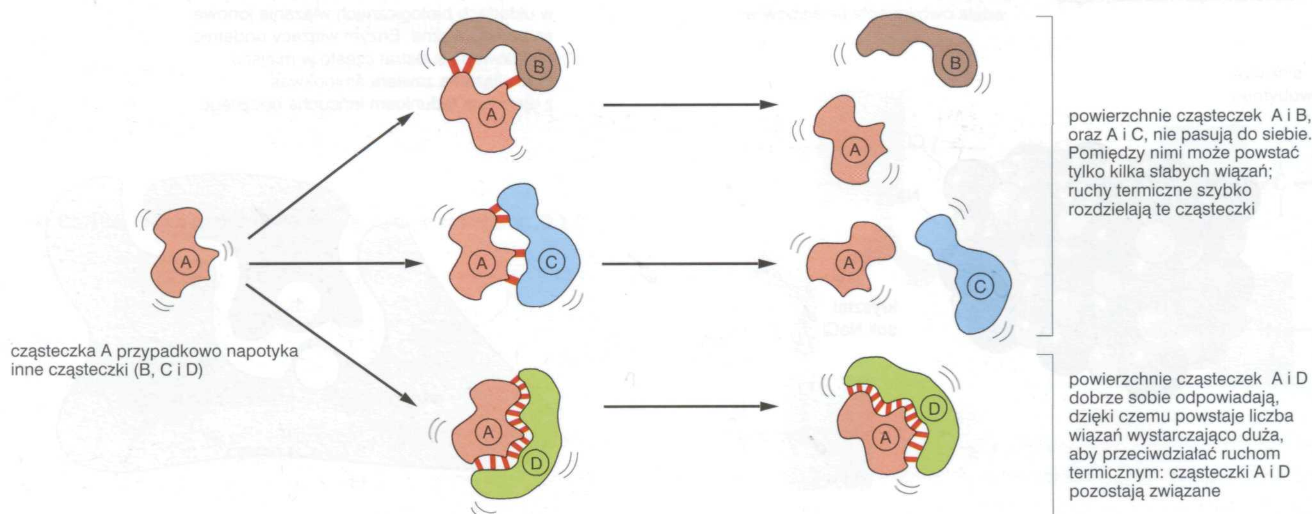
Rys. 2-27. Większość białek i wiele cząsteczek RNA ulega pofałdowaniu prowadzącemu do określonej stabilnej konformacji. Jeśli słabe wiązania stabilizujące określoną konformację ulegną zerwaniu, to cząsteczka przybiera strukturę przypadkową, która zwykle nie ma żadnej wartości biologicznej

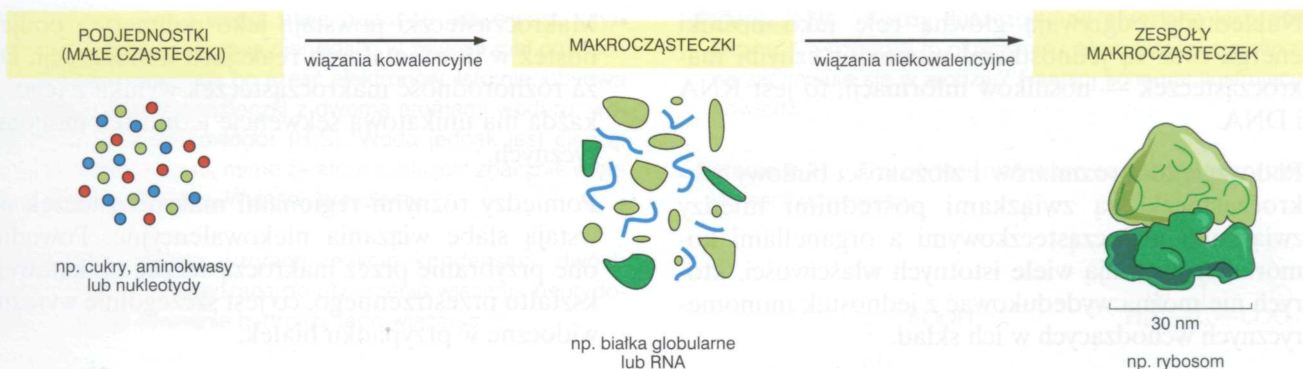
Inna ważna siła działająca na makrocząsteczki wynika z tego, że przestrzenna struktura wody wymusza łączenie się grup hydrofobowych, aby zminimalizować ich niszczący wpływ na sieć wodorowo związanych cząsteczek wody (patrz panel 2-7 oraz panel 2-2, s. 50–51). Powoduje to tendencję do wypierania grup hydrofobowych ze środowiska wodnego, co czasem uważa się za czwarty rodzaj słabych wiązań niekowalencyjnych, określany jako *oddziaływania hydrofobowe*. Oddziaływania te decydują o łączeniu się fosfolipidów w błony biologiczne oraz nadają większości białek zwarty, globularny kształt.

Wiązania niekowalencyjne umożliwiają makrocząsteczkom wybiórcze wiązanie innych cząsteczek

Chociaż poszczególne wiązania niekowalencyjne są bardzo słabe (patrz tab. 2-2, s. 43), jednak w sumie silnie wiążą dwie cząsteczki „pasujące" do siebie kształtem (jak ręka do rękawiczki), dzięki czemu może się tworzyć między nimi wiele takich wiązań (patrz panel 2-7, s. 70–71). Ten rodzaj molekularnych interakcji zapewnia wielką specyficzność wiązania innych cząsteczek przez makrocząsteczki, ponieważ liczne punkty kontaktu, warunkujące silne wiązanie, umożliwiają makrocząsteczkom dokonanie wyboru jednej cząsteczki spośród wielu tysięcy znajdujących

Rys. 2-28. W interakcjach makrocząsteczek uczestniczą wiązania niekowalencyjne





Rys. 2-29. Porównanie wielkości małych cząsteczek, białek i rybosomu. Rybosomy są częścią komórkowego aparatu syntezy białek; każdy rybosom jest zbudowany z około 90 makrocząsteczek (białek i RNA)

się w komórce. Ponieważ siła wiązania zależy od liczby utworzonych wiązań niekowalencyjnych, możliwe są interakcje bardzo różne pod tym względem.

Wiązanie tego typu leży u podstaw biologicznej katalizy, umożliwiając białkom pełnienie funkcji enzymów. Niekowalencyjne wiązania stabilizują także asocjację dwóch makrocząsteczek, jeśli ich powierzchnie dobrze sobie odpowiadają (rys. 2-28). Wiązania te umożliwiają wykorzystanie makrocząsteczek jako elementów konstrukcyjnych w tworzeniu większych struktur. Na przykład białka często łączą się w wielocząsteczkowe kompleksy stanowiące skomplikowane maszyny komórkowe z wieloma ruchomymi elementami, które realizują tak złożone zadania, jak replikacja DNA lub synteza białka (rys. 2-29).

Pytanie 2-9. Dlaczego podczas większości interakcji makrocząsteczek wiązania kowalencyjne nie mogą zastępować wiązań niekowalencyjnych?

Streszczenie

- Żywe komórki podlegają tym samym prawom chemicznym i fizycznym, co materia nieożywiona. Podobnie jak wszystkie inne formy materii, komórki są zbudowane z atomów, będących najmniejszymi chemicznymi jednostkami pierwiastków.
- Atomy są zbudowane z mniejszych cząstek. Jądro atomu zawiera dodatnio naładowane protony oraz obojętne neutrony. Jądro jest otoczone przez chmurę ujemnie naładowanych elektronów.
- Liczba elektronów w atomie jest równa liczbie protonów w jego jądrze. Jądra izotopów tego samego pierwiastka zawierają tyle samo protonów, ale różną liczbę neutronów.
- W skład żywych komórek wchodzi ograniczona liczba pierwiastków, spośród których sześć — C, H, N, O, P, S — stanowi ponad 99% masy komórek.
- Chemiczne właściwości atomu zależą od liczby i rozmieszczenia jego elektronów. Atom jest najbardziej stabilny, gdy wszystkie jego elektrony znajdują się na swoich najniższych poziomach energetycznych i gdy wszystkie jego powłoki elektronowe są całkowicie wypełnione elektronami.
- Wiązania chemiczne pomiędzy atomami tworzą się przez przesunięcia elektronów, zapewniające im bardziej stabilne rozmieszczenie. Zespoły dwóch lub więcej atomów utrzymywanych razem przez wiązania chemiczne określa się jako cząsteczkę.
- W rezultacie przeskoczenia elektronu z jednego atomu na drugi powstają dwa jony o przeciwnych ładunkach. Wzajemne przyciąganie się przeciwnie naładowanych jonów powoduje powstanie wiązania jonowego.
- Wiązanie kowalencyjne powstaje, gdy dwa sąsiednie atomy wspólnie wykorzystują parę elektronów. Jeśli dwie pary elektronów są wspólnie użytkowane, to tworzy się wiązanie podwójne.
- Żywe organizmy zawierają charakterystyczny dla siebie i ograniczony zestaw małocząsteczkowych związków węgla, które w zasadzie są jednakowe we wszystkich żyjących gatunkach. Głównymi rodzajami są cukry, kwasy tłuszczowe, aminokwasy i nukleotydy.
- Podstawowym źródłem energii chemicznej dla komórek są cukry. Wbudowywanie ich do polisacharydów jest formą magazynowania energii.
- Ważną rolę w magazynowaniu energii odgrywają też kwasy tłuszczowe, ale ich najważniejsza funkcja polega na tworzeniu błon w komórce.
- Polimery zbudowane z aminokwasów stanowią bardzo rozmaite i wszechstronne makrocząsteczki, znane jako białka.

- Nukleotydy odgrywają główną rolę jako nośniki energii oraz są jednostkami monomerycznymi makrocząsteczek — nośników informacji, to jest RNA i DNA.
- Pod względem rozmiarów i złożoności budowy makrocząsteczki są związkami pośrednimi między związkami małocząsteczkowymi a organellami komórkowymi. Mają wiele istotnych właściwości, których nie można wydedukować z jednostek monomerycznych wchodzących w ich skład.
- Makrocząsteczki powstają jako polimery z podjednostek w powtarzalnych reakcjach kondensacji. Duża różnorodność makrocząsteczek wynika z tego, że każda ma unikatową sekwencję jednostek monomerycznych.
- Pomiędzy różnymi regionami makrocząsteczek powstają słabe wiązania niekowalencyjne. Powodują one przybranie przez makrocząsteczkę unikatowego kształtu przestrzennego, co jest szczególnie wyraźnie widoczne w przypadku białek.

Hasła

aminokwas	grupa chemiczna	liczba Avogadry	skala pH
atom	hydroliza	masa atomowa	wiązanie chemiczne
ATP	jon	masa cząsteczkowa	wiązanie jonowe
białko	jon hydroniowy	nukleotyd	wiązanie kowalencyjne
cukier	kondensacja	polarność	wiązania niekowalencyjne
cząsteczka	konformacja	proton	
DNA	kwas	RNA	wiązanie wodorowe
elektron	kwas tłuszczowy	sekwencja	zasada

Pytania

Pytanie 2-10. Które z następujących twierdzeń są poprawne? Wyjaśnij odpowiedzi.

A. Jądro atomowe zawiera protony i neutrony.

B. Atom zawiera więcej elektronów niż protonów.

C. Jądro jest otoczone podwójną błoną.

D. Wszystkie atomy tego samego pierwiastka mają jednakową liczbę neutronów.

E. Liczba neutronów decyduje o tym, czy jądro atomu jest stabilne czy promieniotwórcze.

F. Kwasy tłuszczowe oraz polisacharydy mogą być w komórce ważnym magazynem energii.

G. Wiązania wodorowe są słabe i mogą być zerwane przez energię cieplną, ale w znacznym stopniu przyczyniają się do specyficzności interakcji między makrocząsteczkami.

Pytanie 2-11. Aby uzyskać wyobrażenie o wymiarach atomów przyjmijmy, że kartka papieru, na której wydrukowano to pytanie, jest zrobiona wyłącznie z polisacharydu celulozy, której cząsteczki opisuje wzór sumaryczny ($C_nH_{2n}O_n$), gdzie n może być liczbą całkiem dużą i różną w różnych cząsteczkach. Masy atomowe węgla, wodoru i tlenu wynoszą 12, 1, oraz 16, masa kartki papieru wynosi 5 g.

A. Ile atomów węgla znajduje się w tej kartce?

B. Ile atomów węgla zawartego w celulozie musiałoby być ułożonych jeden na drugim, aby uzyskać warstwę odpowiadającą grubości tej kartki (kartka ma wymiary 21 cm x 27,5 cm, a jej grubość wynosi 0,07 mm).

C. Rozważmy teraz problem z innego punktu widzenia. Załóżmy, że kartka papieru jest zbudowana wyłącznie z atomów węgla. Atom węgla ma średnicę $2 \cdot 10^{-10}$m (=0,2 nm); ile atomów węgla o średnicy 0,2 nm zmieściłoby się na odcinku równym grubości tej kartki?

D. Porównaj odpowiedzi na pytania B i C i wyjaśnij różnice, jeśli takie występują.

Pytanie 2-12

A. Maksymalnie ile elektronów może się znajdować na pierwszej, drugiej i trzeciej powłoce elektronowej atomu?

B. Ile elektronów niżej wymienione atomy mogłyby preferencyjnie przyjąć lub oddać, by uzyskać całkowicie wypełnione powłoki elektronowe?

wodór	przyjąć....	oddać....
hel	przyjąć....	oddać....
tlen	przyjąć....	oddać....
węgiel	przyjąć....	oddać....
sód	przyjąć....	oddać....
chlor	przyjąć....	oddać....

C. Co mówią uzyskane odpowiedzi o chemicznych właściwościach tych pierwiastków oraz o wiązaniach, jakie mogłyby się tworzyć między pierwiastkami (np. między sodem a chlorem, między tlenem a wodorem lub między węglem a wodorem)?

Pytanie 2-13. Tlen i siarka mają podobne właściwości chemiczne, ponieważ obydwa pierwiastki w zewnętrznej powłoce elektronowej zawierają po sześć elektronów. Istotnie, obydwa pierwiastki tworzą cząsteczki z dwoma atomami wodoru: wodę (H_2O) oraz siarkowodór (H_2S). Woda jednak jest cieczą, a siarkowodór gazem, mimo że atom siarki jest znacznie większy i cięższy niż tlenu. Wyjaśnij przyczyny.

Pytanie 2-14. Napisz wzorami reakcję kondensacji dwóch aminokwasów, prowadzącą do utworzenia wiązania peptydowego. Napisz równanie hydrolizy tego wiązania.

Pytanie 2-15. Które z następujących twierdzeń są prawdziwe? Wyjaśnij odpowiedzi.

A. Białka są tak bardzo różnorodne, ponieważ każde z nich jest zbudowane z unikatowej mieszaniny aminokwasów, połączonych w przypadkowy sposób

B. Dwuwarstwy lipidowe są makrocząsteczkami zbudowanymi głównie z podjednostek fosfolipidowych.

C. Kwasy nukleinowe zawierają reszty cukrowe.

D. Wiele aminokwasów ma hydrofobowe łańcuchy boczne.

E. Hydrofobowe „ogony" cząsteczek fosfolipidów są odpychane przez wodę.

F. DNA zawiera cztery różne zasady: A, G, U oraz C.

Pytanie 2-16

A. Ile różnych cząsteczek peptydowych złożonych z: a) dwóch, b) trzech, c) czterech aminokwasów można utworzyć korzystając z zestawu dwudziestu aminokwasów występujących w białkach?

B. Załóżmy, że dysponujemy mieszaniną zawierającą po jednej cząsteczce białek o każdej z możliwych sekwencji, przyjmując, że ich średnia masa cząsteczkowa wynosi 4800. Jak duży musiałby być pojemnik, w którym mieściłaby się ta mieszanina? Przyjmujemy, że średnia masa cząsteczkowa reszt aminokwasów wbudowanych w białka wynosi 120.

A. Co wynik tego obliczenia mówi nam o tym, jaka część wszystkich możliwych białek jest faktycznie wykorzystywana przez żywe organizmy (białka mają przeciętną masę cząsteczkową około 30 000).

Pytanie 2-17. To jest podręcznik biologii. Wyjaśnij, dlaczego podstawy chemii opisane w tym rozdziale są ważne w kontekście współczesnej biologii komórki.

Pytanie 2-18

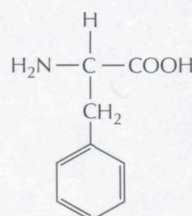
A. Opisz podobieństwa i różnice między wiązaniami van der Waalsa i wodorowymi.

B. Które z tych dwóch wiązań powstałoby a) między dwoma atomami wodoru związanymi z atomami węgla, b) między atomem azotu a atomem wodoru związanym z atomem węgla, c) pomiędzy atomem azotu a wodorem związanym z atomem tlenu?

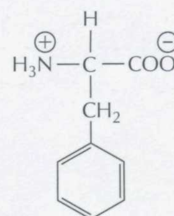
Pytanie 2-19. Jakie siły decydują o fałdowaniu się makrocząsteczki i przybraniu przez nią unikatowego kształtu?

Pytanie 2-20. Kwasy tłuszczowe są określane jako amfipatyczne. Co oznacza to określenie i jak cząsteczka amfipatyczna zachowuje się w wodzie? Narysuj schemat ilustrujący odpowiedź.

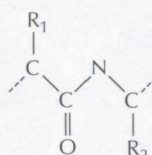
Pytanie 2-21. Czy podane niżej wzory są poprawne czy błędne? Wyjaśnij odpowiedzi.



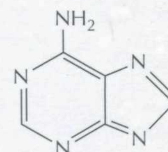
(A)



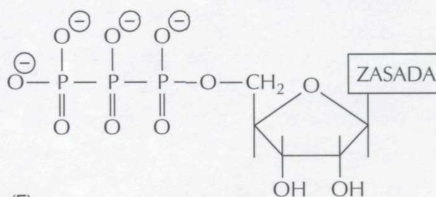
(B)



(C)



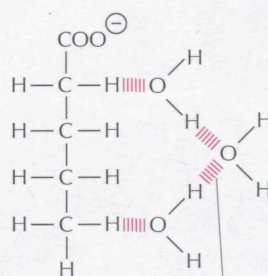
(D)



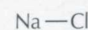
(E)



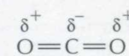
(F)



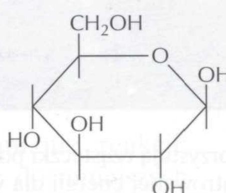
(G)



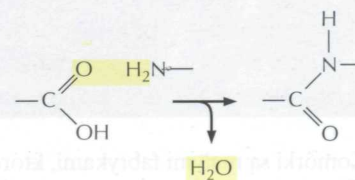
(H)



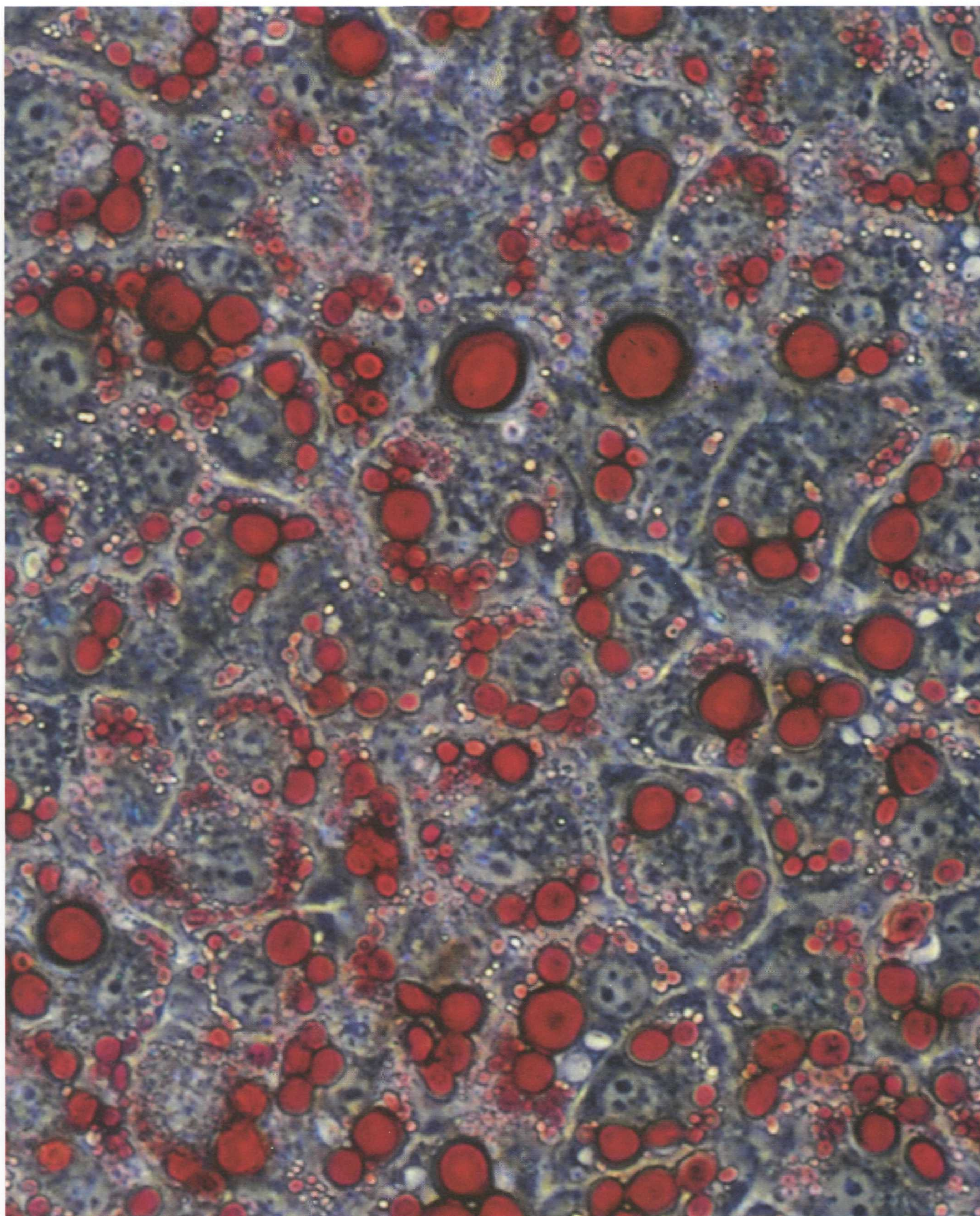
(I)



(J)



(K)



Komórki są małymi fabrykami, które wykorzystują cząsteczki pożywienia jako źródła zarówno elementów budulcowych, jak i energii. Tłuszcz jest ważnym magazynem skoncentrowanej energii dla wszystkich komórek i u zwierząt jest odkładany w komórkach tłuszczowych. Widoczne tutaj krople tłuszczu (*czerwone*) nagromadzają się w rosnących komórkach tłuszczowych. (Dzięki uprzejmości: Ronald M. Evans)

3 Energia, kataliza i biosynteza

PROCESY KATALITYCZNE I WYKORZYSTYWANIE ENERGII PRZEZ KOMÓRKI

- **Biologiczny porządek jest możliwy dzięki uwalnianiu energii cieplnej z komórek**
- **Organizmy fotosyntetyzujące wykorzystują światło słoneczne do syntezy cząsteczek organicznych**
- **Komórki uzyskują energię w wyniku utleniania cząsteczek organicznych**
- **Transport elektronów obejmuje utlenianie i redukcję**
- **Enzymy obniżają barierę, która blokuje reakcje chemiczne**
- **Jak enzymy odnajdują właściwe sobie substraty: znaczenie szybkiej dyfuzji**
- **Zmiana energii swobodnej określa możliwość zajścia reakcji**
- **Wartość $\Delta G°$ zależy od stężenia reaktantów**
- **Dla ciągu reakcji wartości $\Delta G°$ są addytywne**

CZĄSTECZKI AKTYWOWANYCH NOŚNIKÓW A REAKCJE BIOSYNTEZY

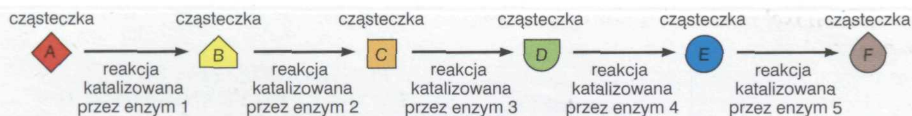
- **Powstawanie zaktywowanych nośników energii jest sprzężone z reakcją energetycznie korzystną**
- **ATP jest zaktywowanym nośnikiem najczęściej używanym w komórce**
- **Energia magazynowana w ATP jest często wykorzystywana do łączenia dwóch cząsteczek**
- **NADH i NADPH są ważnymi nośnikami elektronów**
- **Istnieje wiele innych cząsteczek aktywowanych nośników w komórce**
- **Synteza biopolimerów wymaga dostarczenia energii**

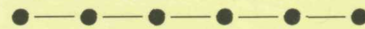
Jedna cecha żywej materii ponad wszystkie inne czyni ją cudownie odmienną od materii nieożywionej: ta pierwsza tworzy i zachowuje uporządkowanie — we wszechświecie zawsze dążącym do wielkiego nieuporządkowania. Aby stworzyć ten stan uporządkowany, komórki żywego organizmu muszą przeprowadzać niekończący się ciąg reakcji chemicznych. W niektórych reakcjach małe cząsteczki organiczne — aminokwasy, cukry, nukleotydy oraz lipidy — ulegają rozkładowi lub są modyfikowane, aby dostarczyć wiele innych małych cząsteczek potrzebnych komórce. W innych reakcjach te same małe cząsteczki używane są do konstruowania niezwykle różnorodnych białek, kwasów nukleinowych i innych makrocząsteczek, które nadają żywym układom wszystkie ich charakterystyczne właściwości.

Aby przeprowadzić wiele reakcji chemicznych koniecznych do przeżycia, żywy organizm potrzebuje nie tylko źródła atomów w postaci cząsteczek pokarmu, lecz także źródła energii. Ostatecznie zarówno atomy, jak i energia muszą pochodzić z środowiska nieożywionego. W rozdziale tym wyjaśnimy, dlaczego komórki potrzebują energii oraz jak używają tej energii i atomów pobranych ze swego środowiska do tworzenia uporządkowania na poziomie molekularnym, które czyni życie możliwym.

Reakcje chemiczne, które przeprowadza komórka, mogłyby normalnie zachodzić tylko w temperaturach znacznie wyższych niż te, które występują wewnątrz komórek. Z tego powodu każda reakcja wymaga specyficznego „doładowania" chemicznej reaktywności. Wymóg ten ma kluczowe znaczenie, ponieważ umożliwia komórce kontrolowanie każdej reakcji. Kontrola taka jest przeprowadzana przez wyspecjalizowane białka — *enzymy*, z których każdy przyspiesza, czyli *katalizuje* tylko jeden z wielu możliwych rodzajów reakcji, którym dane cząsteczki mogą ulegać. Reakcje katalizowane enzymatycznie są zazwyczaj połączone w ciągi, tak że produkt jednej reakcji staje się matriałem wyjściowym — *substratem* dla następnej (rys. 3-1). Te długie liniowe szlaki reakcji są kolejno połączone ze sobą, tworząc labirynt wzajemnie łączących się reakcji, umożliwiający komórce przeżycie, wzrost i reprodukcję (rys. 3-2).

W komórkach występują dwa przeciwstawne strumienie reakcji: 1) Szlaki *kataboliczne* rozkładające substancje odżywcze do mniejszych cząsteczek, w wyniku czego zarówno uwalnia się forma energii użyteczna

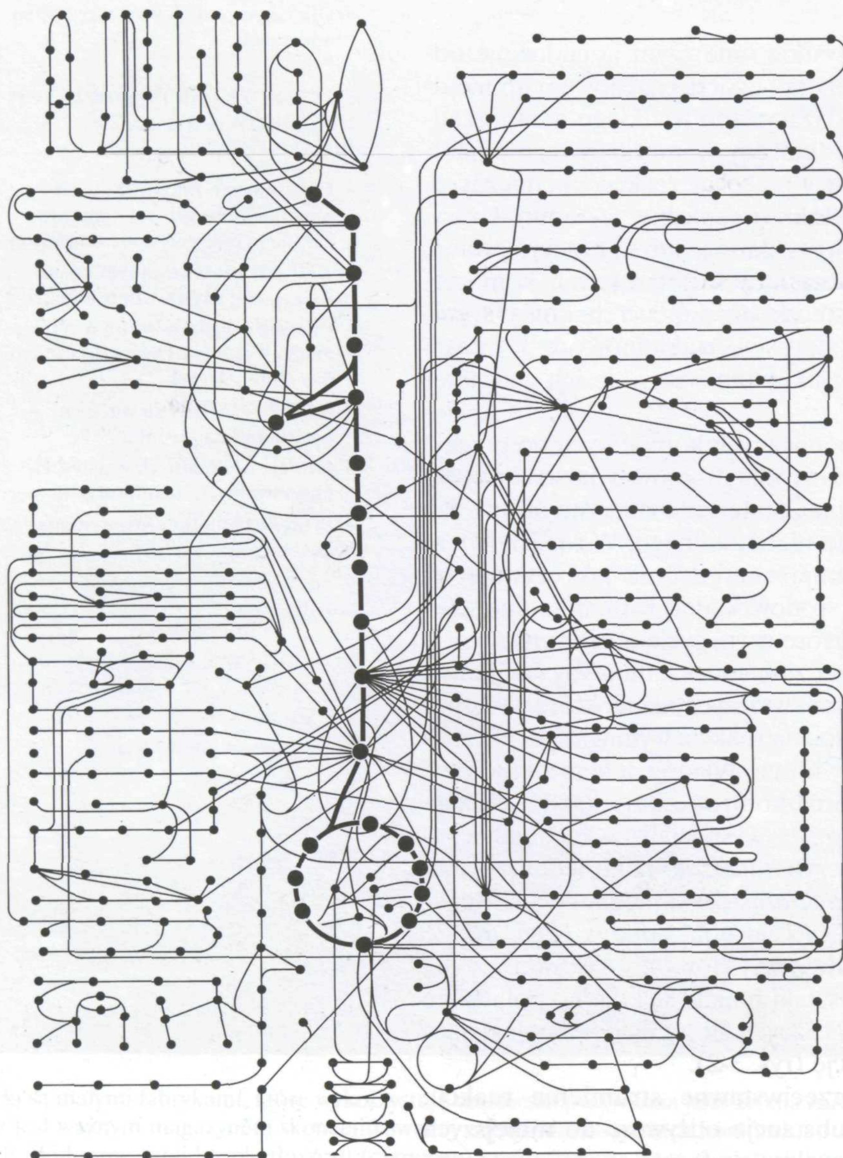




Rys. 3-1. Jak zespół reakcji katalizowanych przez enzymy tworzy szlak metaboliczny. Każdy enzym katalizuje określoną reakcję chemiczną, sam nie ulegając zmianie. W tym przykładzie zespół enzymów działając w szeregu przekształca cząsteczkę A w F, tworząc szlak metaboliczny

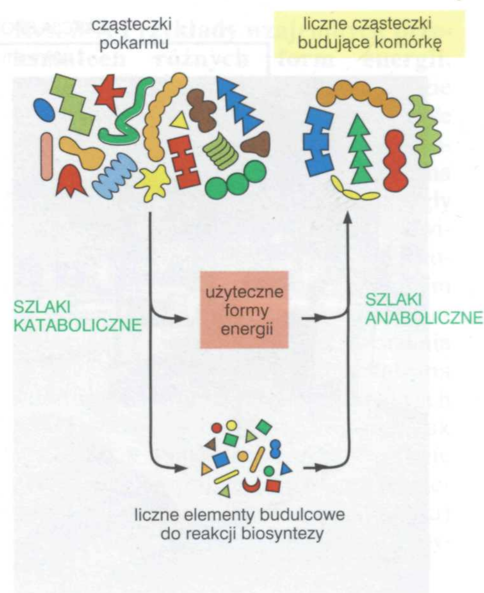
dla komórki, jak i powstają małe cząsteczki chemiczne, które są potrzebne komórce jako elementy budulcowe, oraz 2) szlaki *anaboliczne*, czyli *biosyntetyczne,* używające energii uzyskanej przez katabolizm do przeprowadzenia syntezy wielu innych cząsteczek, które budują komórkę. Razem te dwa zespoły reakcji składają się na **metabolizm** komórki (rys. 3-3).

Wiele elementów metabolizmu komórki jest przedmiotem *biochemii* i nie musi być tu omawiane. Jednakże ogólne prawa rządzące uzyskiwaniem energii ze środowiska oraz użycie jej do tworzenia stanu uporządkowania przez komórkę mają dla biologii komórki zasadnicze znaczenie. Zarys tych praw jest przedmiotem tego rozdziału, który rozpoczniemy od dyskusji o tym, dlaczego stały dopływ energii jest potrzebny do utrzymania organizmów przy życiu.



Rys. 3-2. Niektóre szlaki metaboliczne i ich wzajemne powiązania w typowej komórce. Około 500 podstawowych reakcji metabolicznych pokazano w formie schematu, gdzie każda cząsteczka w szlaku metabolicznym jest przedstawiona jako czarne kółko, tak jak na *żółtym tle* na rys. 3-1.

Rys. 3-3. Schematyczny obraz zależności między szlakami katabolicznymi i anabolicznymi w metabolizmie. Ponieważ większa część energii magazynowanej w wiązaniach chemicznych cząsteczek pożywienia ulega rozproszeniu w postaci ciepła, masa pożywienia potrzebna organizmowi, który uzyskuje całą energię z reakcji katabolicznych, jest dużo większa niż łączna masa cząsteczek, które mogą być wytworzone w reakcjach anabolicznych



Procesy katalityczne i wykorzystywanie energii przez komórki

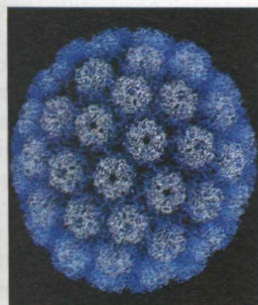
Materia nieożywiona pozostawiona samej sobie stanie się w końcu nieuporządkowaną: budynki rozpadają się, a martwe organizmy ulegają rozkładowi. Natomiast żywe komórki nie tylko utrzymują, ale nawet wytwarzają stan uporządkowania na każdym poziomie, od wielkiej skali struktury motyla czy kwiatu, do ułożenia atomów w cząsteczkach, z których te organizmy są zbudowane (rys. 3-4). Ta właściwość życia jest możliwa dzięki złożonym mechanizmom komórkowym, które czerpią energię z otoczenia i przekształcają ją w formy, które mogą być użyte przez komórkę do stałego tworzenia biologicznego porządku.

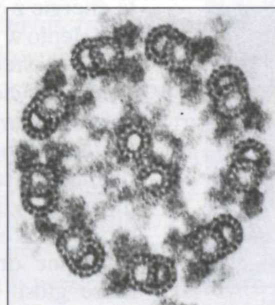
Biologiczny porządek jest możliwy dzięki uwalnianiu energii cieplnej z komórek

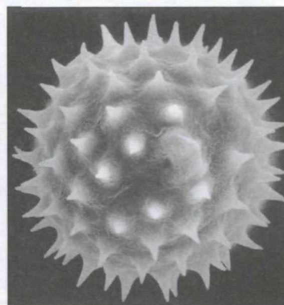
Uniwersalna tendencja do wzrostu stanu nieuporządkowania jest wyrażona w podstawowym prawie fizyki — *drugim prawie termodynamiki*, które mówi, że we wszechświecie lub w dowolnym układzie izolowanym (zbiorze materii, który jest całkowicie oddzielony od reszty wszechświata) stopień nieuporządkowania może tylko wzrastać. Prawo to ma tak głębokie implikacje dla wszystkich żywych organizmów, że warte jest przeanalizowania w różnych ujęciach.

Możemy na przykład przedstawić drugie prawo w kategoriach prawdopodobieństwa i stanu układu zmieniającego się spontanicznie w kierunku uporządkowania o największym prawdopodobieństwie. Jeżeli rozważymy na przykład pudełko ze stu monetami leżącymi orłem do góry, seria wstrząsów jakim zostanie poddane pudełko, będzie prowadzić do przesunięcia rozmieszczenia monet w kierunku ułożenia 50 orłów i 50 reszek do góry. Przyczyna jest prosta: istnieje ogromna liczba możliwych rozmieszczeń poszczególnych monet w mieszaninie, która pozwoli osiągnąć wynik 50/50, ale tylko jedno możliwe rozmieszczenie, w którym wszystkie monety będą ustawione orłem do góry. Ponieważ mieszanina 50/50 jest najbardziej prawdopodobna, mówimy, że jest bardziej „nieuporządkowana". Z tego samego powodu, jak wszyscy tego doświadczamy, przestrzeń życiowa każdego z nas staje się — bez celowego działania w tym kierunku — co-

Rys. 3-4. Uporządkowanie w strukturach biologicznych. Dokładnie określony, ozdobny i piękny wzór przestrzenny można znaleźć na każdym poziomie organizacji żywych organizmów. W kolejności wzrastających rozmiarów: (A) cząsteczka białka okrywy wirusa; (B) regularny pierścień mikrotubul widziany w przekroju poprzecznym wici plemnika; (C) kontury powierzchni ziarna pyłku (pojedyncza komórka); (D) skrzydło motyla przedstawia wzór utworzony z łusek, gdzie każda łuska jest produktem pojedynczej komórki; (E) spiralny układ nasion, złożony z milionów komórek, w kwiecie słonecznika. (Dzięki uprzejmości: A — Robert Grant, Stéphane Crainic i James M. Hogle, B — Lewis Tilney, C — Colin MacFarlane i Chris Jeffree, D i E — Kjell B. Sandved)


(A)


(B)


(C)


(D)


(E)

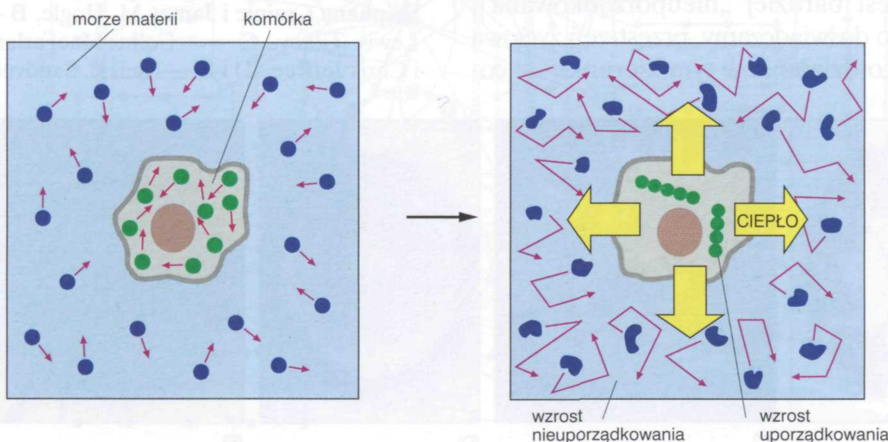


Rys. 3-5. Codzienny obraz spontanicznego doprowadzania do nieporządku. Odwracanie tej tendencji do nieuporządkowania wymaga celowego działania oraz nakładu energii: nie jest to spontaniczne. Rzeczywiście według drugiego prawa termodynamiki możemy być pewni, że potrzebna interwencja człowieka uwolni dosyć ciepła do otoczenia, aby skompensować porządkowanie przedmiotów w tym pokoju

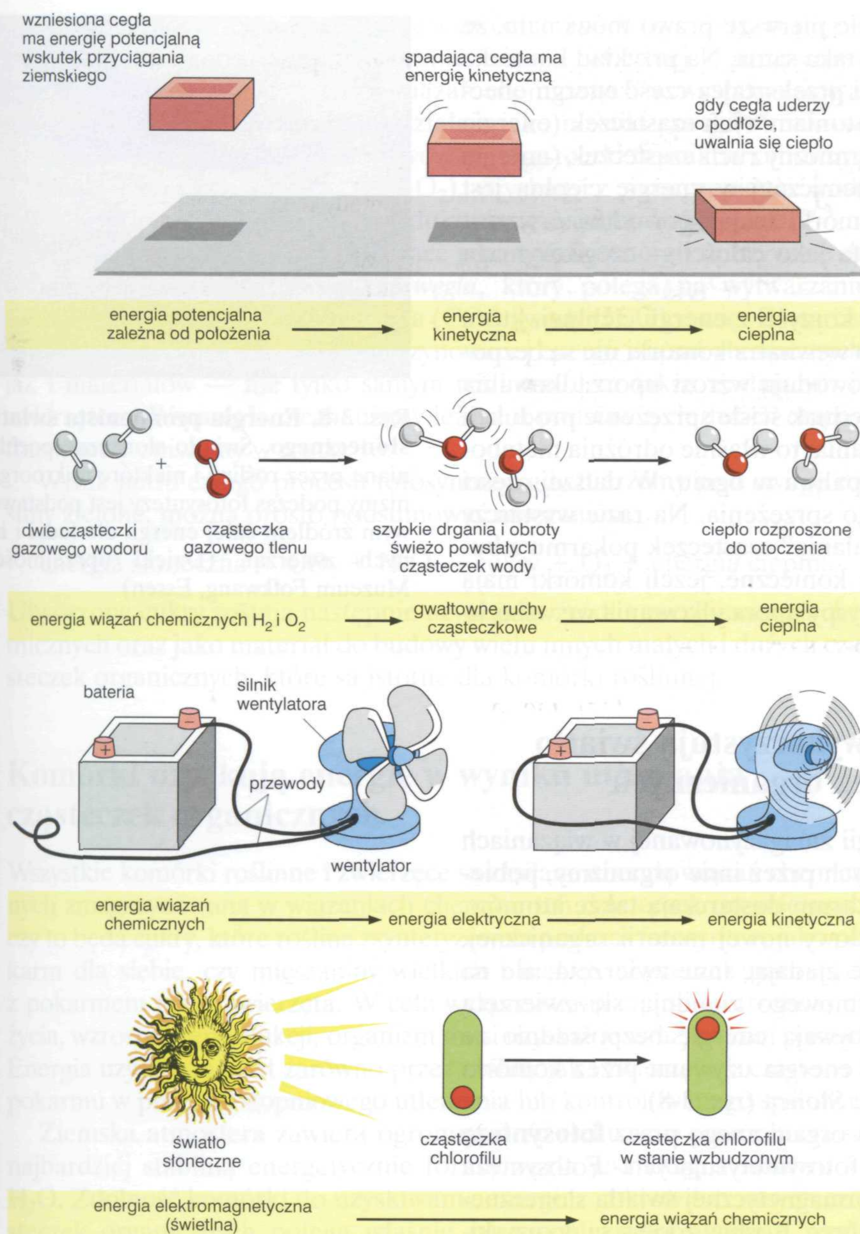
raz bardziej nieuporządkowana: przesunięcie w kierunku stanu nieuporządkowania jest *procesem spontanicznym*, wymagającym okresowego działania w celu odwrócenia tego procesu (rys. 3-5).

Stopień uporządkowania układu można określać ilościowo. Wielkość używana jako miara tego stanu nieuporządkowania nazywa się **entropią** układu: im większy stan nieuporządkowania, tym większa entropia. Tak więc kolejnym sposobem wyrażenia drugiego prawa termodynamiki jest stwierdzenie, że układy ulegają spontanicznym zmianom w kierunku takiego ułożenia elementów, które charakteryzuje się największą entropią.

Żywe komórki — utrzymując się przy życiu, rosnąc oraz tworząc złożone organizmy — wytwarzają stan uporządkowania; w ten sposób mogłoby się wydawać, że zaprzeczają drugiemu prawu termodynamiki. Jak to możliwe? Odpowiedzią jest to, że komórka nie jest układem izolowanym: pobiera energię ze środowiska w postaci pożywienia lub ze Słońca w postaci fotonów (lub nawet — w przypadku niektórych bakterii chemosyntetyzujących z cząsteczek nieorganicznych), a następnie używa tej energii do tworzenia stanu uporządkowanego wewnątrz komórki. W ciągu reakcji biochemicznych prowadzących do stanu uporządkowania, część energii, której używa komórka, jest przekształcana w ciepło. Ciepło rozprasza się w otoczeniu komórki, zwiększając stan nieuporządkowania otoczenia, tak że całkowita entropia — komórki i otoczenia — wzrasta, jak wymagają tego prawa fizyki.



Rys. 3-6. Prosta analiza termodynamiczna żywej komórki. Na schemacie po lewej zarówno cząsteczki komórki, jak i reszta wszechświata (morze materii) są w stanie względnego nieuporządkowania. Na schemacie po prawej komórka pobrała energię z cząsteczek pożywienia i uwolniła ciepło w wyniku reakcji, która porządkuje cząsteczki zawarte w komórce. Ponieważ ciepło zwiększa stan nieuporządkowania w środowisku wokół komórki (przedstawiony jako *łamane strzałki* i nieregularne kształty cząsteczek, wskazujące na intensyfikację ruchów cząsteczek) w czasie wzrostu i podziału komórki zostaje spełnione drugie prawo termodynamiki, które głosi, że ilość nieuporządkowania we wszechświecie musi zawsze wzrastać



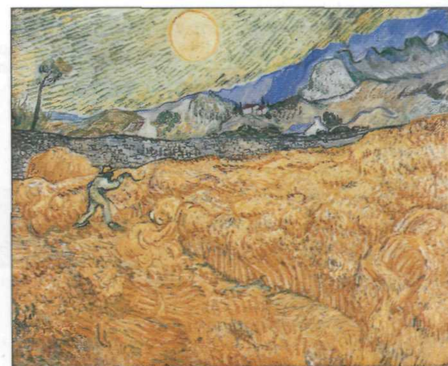
Rys. 3-7. Przykłady wzajemnych przekształceń różnych form energii. Wszystkie formy energii mogą w zasadzie ulegać wzajemnym przekształceniom. We wszystkich tych procesach zostaje zachowana całkowita ilość energii; tak więc na podstawie wysokości i masy cegły w pierwszym przykładzie możemy przewidzieć, jak wiele ciepła zostanie uwolnione, gdy uderzy ona o podłogę. W drugim przykładzie duża ilość energii wiązań chemicznych uwalniana podczas tworzenia wody jest początkowo przekształcana w bardzo szybkie ruchy termiczne dwóch nowoutworzonych cząsteczek, jednak zderzenia z innymi cząsteczkami prawie natychmiat rozpraszają tę energię kinetyczną w otoczeniu (przenoszenie ciepła) czyniąc nowe cząsteczki nieodróżnialnymi od reszty

Aby zrozumieć prawa rządzące tymi przekształceniami energii, należy pomyśleć o komórce znajdującej się w morzu materii stanowiącej resztę wszechświata. Komórka żyjąc i rosnąc tworzy wewnętrzny porządek na koszt tego morza, ponieważ w czasie syntezy cząsteczek i tworzenia z nich swojej struktury uwalnia energię cieplną. Ciepło jest energią w jej najbardziej nieuporządkowanej formie — przypadkowych zderzeń cząsteczek. Podczas uwalniania ciepła do morza przez komórkę, w morzu wzrasta intensywność ruchu cząsteczek (ruchy termiczne), wskutek czego wzrasta przypadkowość, czyli stopień nieuporządkowania morza. Drugie prawo termodynamiki jest spełnione, ponieważ wzrost stopnia uporządkowania wewnątrz komórki jest z nadmiarem kompensowany ogromnym spadkiem stopnia uporządkowania (wzrostem entropii) w otaczającym morzu materii (rys. 3-6).

Skąd pochodzi ciepło uwalniane przez komórkę? Dochodzimy tu do innego, ważnego prawa termodynamiki. Zgodnie z *pierwszym prawem termodynamiki* energia może być przekształcana z jednej postaci w drugą, ale nie może być tworzona lub niszczona. Niektóre formy energii przedstawiono na rys. 3-7. Ilość energii w różnych postaciach zmienia się w wyniku re-

akcji chemicznych wewnątrz komórki, ale pierwsze prawo mówi nam, że całkowita energia musi zawsze pozostać taka sama. Na przykład komórka zwierzęca pobiera substancje odżywcze i przekształca część energii obecnej w wiązaniach chemicznych między atomami tych cząsteczek (energię wiązań chemicznych) w przypadkowy termiczny ruch cząsteczek (energię cieplną). To przekształcenie energii chemicznej w energię cieplną jest niezbędne, jeżeli reakcje wewnątrz komórki mają spowodować wzrost stopnia nieuporządkowania wszechświata jako całości — czego wymaga drugie prawo termodynamiki.

Komórka nie może uzyskać żadnych korzyści z energii cieplnej, którą uwalnia, jeżeli reakcje generujące ciepło wewnątrz komórki nie są bezpośrednio związane z procesami, które powodują wzrost uporządkowania molekularnego. W komórkach istnieje jednak ścisłe sprzężenie produkcji ciepła ze wzrostem stopnia uporządkowania; to właśnie odróżnia metabolizm komórki od rozrzutnego spalania paliwa w ogniu. W dalszej części rozdziału przedstawimy mechanizm tego sprzężenia. Na razie wystarczy uznać, że bezpośrednie powiązanie „spalania" cząsteczek pokarmu z budowaniem porządku biologicznego jest konieczne, jeżeli komórki mają być zdolne do tworzenia i zachowania wyspy uporządkowania we wszechświecie dążacym ku chaosowi.



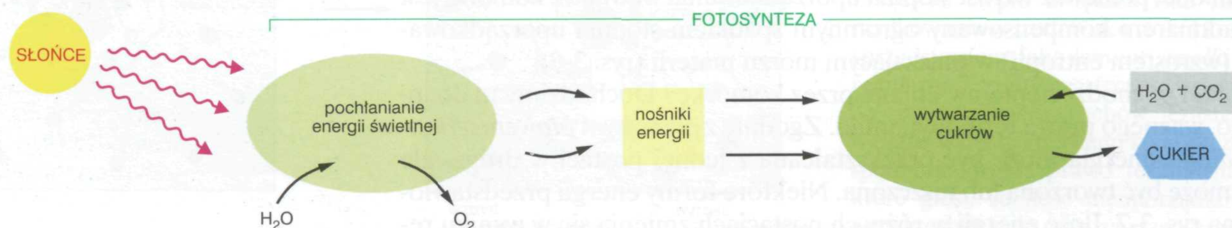
Rys. 3-8. Energia promienista światła słonecznego. Światło słoneczne pochłaniane przez rośliny i niektóre mikroorganizmy podczas fotosyntezy jest podstawowym źródłem całej energii dla ludzi i innych zwierząt. (Dzięki uprzejmości: Muzeum Folkwang, Essen)

Organizmy fotosyntetyzujące wykorzystują światło słoneczne do syntezy cząsteczek organicznych

Wszystkie zwierzęta żyją na koszt energii zmagazynowanej w wiązaniach cząsteczek organicznych zsyntetyzowanych przez inne organizmy, pobieranych jako pożywienie. Cząsteczki pokarmu dostarczają także atomów, które są potrzebne zwierzętom do budowy nowej materii organicznej. Niektóre zwierzęta uzyskują pożywienie zjadając inne zwierzęta, ale na początku zwierzęcego łańcucha pokarmowego znajdują się zwierzęta zjadające rośliny. Rośliny z kolei zdobywają energię bezpośrednio ze światła słonecznego. W rezultacie cała energia używana przez komórki zwierzęce jest uzyskiwana ostatecznie ze Słońca (rys. 3-8).

Energia słoneczna wkracza do świata organicznego przez **fotosyntezę** zachodzącą w roślinach i bakteriach fotosyntetyzujących. Fotosynteza umożliwia przekształcenie energii elektormagnetycznej światła słonecznego w energię wiązań chemicznych w komórce. Rośliny zdolne są do uzyskiwania wszystkich potrzebnych im atomów z nieorganicznych źródeł: węgla — z atmosferycznego dwutlenku węgla, wodoru i tlenu — z wody, azotu — z amoniaku i azotanów w glebie, a innych elementów potrzebnych w niewielkich ilościach — z nieorganicznych soli w glebie. Używają one energii uzyskanej ze światła słonecznego do wbudowywania tych atomów w cząsteczki cukrów, aminokwasów, nukleotydów i kwasów tłuszczowych. Te małe cząsteczki są z kolei przekształcane w białka, kwasy nukleinowe, polisacharydy i lipidy, budujące roślinę. Wszystkie te substancje służą jako cząsteczki pożywienia dla zwierząt, jeżeli rośliny są później zjadane.

Rys. 3-9. Fotosynteza. Dwa etapy fotosyntezy. Nośnikami energii utworzonymi w pierwszym etapie są dwie cząsteczki — ATP i NADPH, które omówimy wkrótce



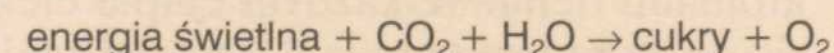
Reakcje fotosyntezy odbywają się w dwóch etapach (rys. 3-9). W pierwszym etapie zachodzi wychwytywanie energii świetlnej i przejściowe magazynowanie jej jako energii wiązań chemicznych w wyspecjalizowanych małych cząsteczkach, które działają jako nośniki energii i reaktywnych grup chemicznych. (Te zaktywowane cząsteczki nośników omówimy później). Tlen cząsteczkowy (gaz O_2), uzyskany z rozszczepienia wody przez światło, uwalnia się jako produkt uboczny pierwszego etapu.

W drugim etapie cząsteczki służące jako nośniki energii są używane do wspomagania procesu *asymilacji węgla*, który polega na wytwarzaniu cukrów z gazowego dwutlenku węgla (CO_2) i wody (H_2O), a więc dostarcza zarówno użytecznego źródła zmagazynowanej energii wiązań chemicznych, jak i materiałów — nie tylko samym roślinom, lecz także zjadającym je zwierzętom. Wspaniałe mechanizmy leżące u podstaw tych dwóch etapów fotosynetzy opiszemy w rozdz. 13.

Wynik netto całego procesu fotosyntezy, gdy bierzemy pod uwagę rośliny zielone, można prosto podsumować równaniem:


energia słoneczna + CO_2 + $H_2O \rightarrow$ cukry + O_2 + energia cieplna

Utworzone cukry zostają następnie użyte jako źródło energii wiązań chemicznych oraz jako materiał do budowy wielu innych małych i dużych cząsteczek organicznych, które są istotne dla komórki roślinnej.

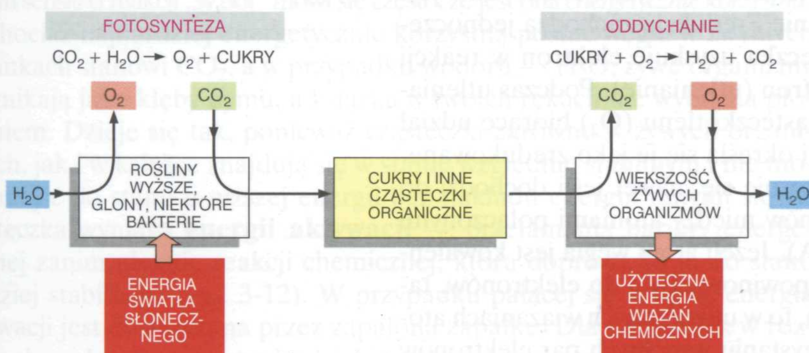
Pytanie 3-1. Rozważmy równanie

energia świetlna + CO_2 + $H_2O \rightarrow$ cukry + O_2
Czy spodziewasz się, że tę reakcję przeprowadza pojedynczy enzym? Dlaczego w tej reakcji uwalniane jest także ciepło? Wyjaśnij odpowiedź.

Komórki uzyskują energię w wyniku utleniania cząsteczek organicznych

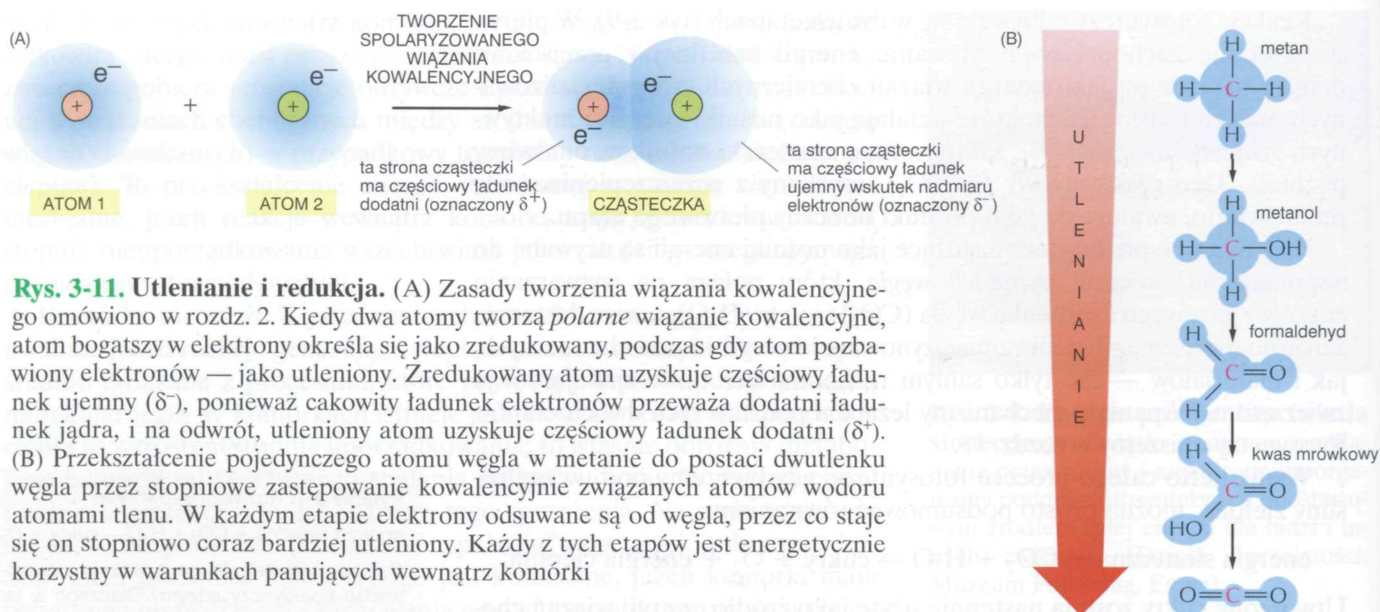
Wszystkie komórki roślinne i zwierzęce są zasilane energią wiązań chemicznych zmagazynowaną w wiązaniach chemicznych cząsteczek organicznych, czy to będą cukry, które roślina zsyntetyzowała podczas fotosyntezy jako pokarm dla siebie, czy mieszaniny wielkich i małych cząsteczek pobranych z pokarmem przez zwierzęta. W celu wykorzystania energii potrzebnej do życia, wzrostu i reprodukcji, organizm musi uzyskać ją w użytecznej postaci. Energia uzyskiwana jest zarówno przez rośliny jak i zwierzęta, z cząsteczek pokarmu w procesie stopniowego utleniania lub kontrolowanego spalania.

Ziemska atmosfera zawiera ogromną ilość tlenu, a w jego obecności najbardziej stabilną energetycznie formą węgla jest CO_2, a wodoru H_2O. Zdolność komórki do uzyskiwania energii z cukrów lub innych cząsteczek organicznych polega właśnie na umożliwieniu atomom węgla i wodoru łączenie się z tlenem, w wyniku czego powstaje odpowiednio CO_2 i H_2O; ten proces nazywamy **oddychaniem**.

Fotosynteza i oddychanie są procesami komplementarnymi (rys. 3-10). Oznacza to, że nie wszystkie relacje między roślinami i zwierzętami są jednokierunkowe. Rośliny, zwierzęta i mikroorganizmy istniały razem na tej planecie tak długo, że wiele z nich stało się istotną częścią środowiska



Rys. 3-10. Fotosynteza i oddychanie jako dwa uzupełniające się procesy w świecie ożywionym. Fotosynteza zużytkowuje energię słoneczną do wytwarzania cukrów i innych cząsteczek organicznych. Cząsteczki te z kolei służą jako pożywienie dla innych organizmów. Wiele z tych organizmów w procesie oddychania zużywa O_2 do tworzenia CO_2 z tych samych atomów węgla, które zostały pobrane jako CO_2 i przekształcone w cukry podczas fotosyntezy. W procesie tym oddychające organizmy uzyskują energię wiązań chemicznych, której potrzebują do przeżycia. Sądzi się, że pierwsze komórki na Ziemi nie były zdolne ani do fotosyntezy, ani do oddychania (patrz rozdz. 13). Fotosynteza musiała jednakże na Ziemi poprzedzać oddychanie, ponieważ istnieją przekonujące dowody na to, że potrzebna było miliardów lat fotosyntezy, aby uwolnić tlen w ilości wystarczającej do utworzenia atmosfery bogatej w ten gaz. (Ziemska atmosfera zawiera obecnie 20% O_2)



Rys. 3-11. Utlenianie i redukcja. (A) Zasady tworzenia wiązania kowalencyjnego omówiono w rozdz. 2. Kiedy dwa atomy tworzą *polarne* wiązanie kowalencyjne, atom bogatszy w elektrony określa się jako zredukowany, podczas gdy atom pozbawiony elektronów — jako utleniony. Zredukowany atom uzyskuje częściowy ładunek ujemny (δ^-), ponieważ cakowity ładunek elektronów przeważa dodatni ładunek jądra, i na odwrót, utleniony atom uzyskuje częściowy ładunek dodatni (δ^+). (B) Przekształcenie pojedynczego atomu węgla w metanie do postaci dwutlenku węgla przez stopniowe zastępowanie kowalencyjnie związanych atomów wodoru atomami tlenu. W każdym etapie elektrony odsuwane są od węgla, przez co staje się on stopniowo coraz bardziej utleniony. Każdy z tych etapów jest energetycznie korzystny w warunkach panujących wewnątrz komórki

innych organizmów. Tlen uwalniany podczas fotosyntezy zużywany jest do „spalania" cząsteczek organicznych przez prawie wszystkie organizmy. Z kolei niektóre cząsteczki CO_2, które zostały zasymilowane dziś w zielonych liściach, były uwolnione wczoraj do atmosfery w czasie oddychania zwierząt — albo grzybów lub bakterii rozkładających martwą materię organiczną. Widać stąd, że obieg węgla tworzy ogromny cykl, który obejmuje *biosferę* (wszystkie żywe organizmy na Ziemi) jako całość, przekraczając granicę pomiędzy poszczególnymi organizmami. Podobnie atomy azotu, fosforu i siarki przemieszczają się między światem ożywionym a nieożywionym w cyklach obejmujących rośliny, zwierzęta, grzyby i bakterie.

Transport elektronów obejmuje utlenianie i redukcję

Komórka nie utlenia cząsteczek organicznych w jednym etapie, jak podczas spalania materii organicznej w ogniu. Używając katalizy enzymatycznej metabolizm prowadzi cząsteczki przez dużą liczbę reakcji, które rzadko obejmują bezpośrednie przyłączenie tlenu. Zanim rozpatrzymy niektóre z tych reakcji oraz ich cele, musimy ustalić, co rozumiemy pod pojęciem procesu utleniania.

Utlenianie w sensie użytym powyżej nie oznacza tylko dodania atomów tlenu; odnosi się ogólnie do każdej reakcji, w której elektrony są przenoszone z jednego atomu na inny. Utlenianie w tym znaczeniu oznacza usunięcie elektronów, a **redukcja** — odwrotność utleniania — dodanie elektronów. Tak więc Fe^{2+} zostanie utlenione, jeżeli straci elektron, stając się Fe^{3+}, a atom chloru jest zredukowany, jeżeli uzyska elektron, stając się Cl^-. Ponieważ w reakcjach chemicznych liczba elektronów jest stała (nie ma strat ani zysków), utlenianie i redukcja zachodzą jednocześnie: to oznacza, że jeżeli jedna cząsteczka uzyskuje elektron w reakcji (redukcja), druga cząsteczka traci elektron (utlenianie). Podczas utleniania cząsteczki cukru do CO_2 i H_2O, cząsteczki tlenu (O_2) biorące udział w tworzeniu H_2O otrzymują elektrony i określa się je jako zredukowane.

Terminy „utlenianie" i „redukcja" stosuje się, nawet jeśli dochodzi do częściowego tylko przesunięcia elektronów między atomami połączonymi przez wiązania kowalencyjne (rys. 3-11A). Jeżeli atom węgla jest kowalencyjnie związany z atomem o większym powinowactwie do elektronów, takim jak tlen, chlor czy na przykład siarka, to w utworzonych wiązaniach atomy mają niejednakowy udział w wykorzystaniu wspólnych par elektronów

i tworzą *spolaryzowane* wiązanie kowalencyjne: dodatni ładunek jądra węgla jest trochę większy niż ujemny ładunek jego elektronów, a zatem atom uzyskuje częściowy ładunek dodatni i określa się go jako utleniony. Atom węgla w wiązaniu C—H jest natomiast nieco bogatszy w elektrony i dlatego określa się go jako atom zredukowany (rys. 3-11B). Gdy cząsteczka w komórce pobiera elektron (e^-), często pobiera też w tym samym czasie proton (H^+) (wolne protony są dostępne w wodzie). Wynikiem netto jest w tym przypadku dodanie atomu wodoru do cząsteczki



$$A + e^- + H^+ \rightarrow AH$$

Nawet jeśli w grę wchodzi proton i elektron (zamiast samego elektronu), takie reakcje *uwodorowania* są reakcjami redukcji i odwrotnie, reakcje *odwodorowania* są reakcjami utleniania. Bardzo łatwo jest stwierdzić, czy cząsteczka organiczna jest utleniana, czy redukowana: redukcja zachodzi gdy liczba wiązań C—H wzrasta, natomiast podczas utleniania liczba wiązań C—H maleje.

Komórki używają enzymów do katalizowania utleniania cząsteczek organicznych poprzez ciąg reakcji, małymi etapami, które umożliwiają zdobywanie użytecznej energii. Musimy teraz wyjaśnić, jak działają enzymy, i omówić niektóre z warunków ograniczających ich działanie.

Pytanie 3-2. W których z następujących reakcji atom zaznaczony kolorem czerwonym ulega utlenieniu?

A. $Na \rightarrow Na^+$ (atom Na → jon Na^+)
B. $Cl \rightarrow Cl^-$ (atom Cl → jon Cl^-)
C. $CH_3CH_2OH \rightarrow CH_3CHO$ (etanol → aldehyd octowy)
D. $CH_3CHO \rightarrow CH_3COOH$ (aldehyd octowy → kwas octowy)
E. $CH_2{=}CH_2 \rightarrow CH_3CH_3$ (eten → etan)

Enzymy obniżają barierę, która blokuje reakcje chemiczne

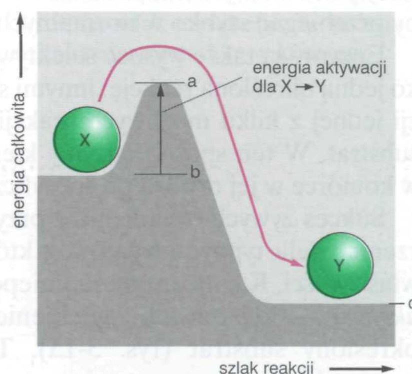
Rozpatrzmy reakcję:



$$\text{papier} + O_2 \rightarrow \text{dym} + \text{popiół} + \text{ciepło} + CO_2 + H_2O$$

Papier spala się łatwo, uwalniając do atmosfery energię jako ciepło oraz wodę i dwutlenek węgla jako gazy, ale dym i popiół nigdy spontanicznie nie odzyskają tych produktów z rozgrzanej atmosfery i nie odtworzą z nich na powrót papieru. Kiedy papier się spala, jego energia chemiczna jest rozpraszana jako ciepło — ale nie jest tracona przez wszechświat, ponieważ energia nie może powstawać ani znikać, tylko nieodwracalnie rozprasza się w chaotycznych, przypadkowych ruchach cieplnych cząsteczek. W tym samym czasie atomy i cząsteczki papieru ulegają rozproszeniu, zwiększając stopień nieuporządkowania. W języku termodynamiki mówi się o utraceniu *energii swobodnej*, to znaczy energii, która może zostać zużyta do wykonania pracy mechanicznej lub przeprowadzenia reakcji chemicznej. Strata ta jest odzwierciedleniem utraty uporządkowania, w jakim energia i cząsteczki były magazynowane w papierze. Wkrótce omówimy energię swobodną bardziej szczegółowo, ale główne zasady intuicyjnie są już wystarczająco zrozumiałe: reakcje chemiczne zachodzą tylko w kierunku prowadzącym do utraty energii swobodnej; innymi słowy spontaniczny kierunek jakiejkolwiek reakcji jest kierunkiem idącym „w dół". W tym sensie o reakcji „w dół" mówi się często, że jest ona *energetycznie korzystna*.

Chociaż najbardziej energetycznie korzystną postać węgla w zwykłych warunkach stanowi CO_2, a w przypadku wodoru — H_2O, żywe organizmy nie znikają jako kłęby dymu, a książka w twoich rękach nie wybucha płomieniem. Dzieje się tak, ponieważ cząsteczki zarówno w żywych organizmach, jak i w książce znajdują się w stanie względnie stabilnym i nie mogą przejść do stanu o niższej energii bez nakładu energii: innymi słowy, cząsteczka wymaga **energii aktywacji** — przełamania bariery energetycznej zanim ulegnie reakcji chemicznej, która doprowadzi ją do stanu bardziej stabilnego (rys. 3-12). W przypadku palącej się książki, energia aktywacji jest dostarczana przez zapaloną zapałkę. Dla cząsteczek w roztworach wodnych wewnątrz komórki to przełamanie umożliwiają rzadkie



Rys. 3-12. Zasada energii aktywacji. Element X znajduje się w stabilnym stanie, a do przekształcenia go w element Y potrzeba energii, mimo że Y znajduje się na niższym poziomie energetycznym niż X. Zatem przekształcenie to nie zajdzie, dopóki element X nie uzyska wystarczającej ilości energii aktywacji (*różnica energii* $a - b$) z otoczenia do przeprowadzenia reakcji przekształcającej go w element Y. Energii tej mogą dostarczyć niezwykle energiczne zderzenia z innymi cząsteczkami. Dla odwrotnej reakcji Y → X energia aktywacji będzie dużo większa (*różnica energii* $a - c$); dlatego reakcja ta zachodzi dużo rzadziej. Energia aktywacji ma zawsze wartość dodatnią; zauważ jednak, że całkowita zmiana energii dla reakcji korzystnej energetycznie X → Y, czyli *różnica energii* $c - b$ jest liczbą ujemną



Rys. 3-13. Obniżenie energii aktywacji silnie zwiększa prawdopodobieństwo zajścia reakcji. Populacja identycznych cząsteczek substratu ma szeroki zakres energii, której rozkład dla każdej poszczególnej chwili przedstawia wykres. Różnorodność stanów energetycznych jest skutkiem zderzeń z otaczającymi cząsteczkami, powodujących chaotyczny ruch, drganie i wirowanie cząsteczek. Aby cząsteczka mogła ulec reakcji chemicznej, jej energia musi przekroczyć energię aktywacji, co dla większości reakcji biologicznych nie zdarza się bez katalizy enzymatycznej. Nawet w czasie reakcji katalizowanej przez enzym cząsteczka substratu musi ulec szczególnie energicznym zderzeniom, aby zaszła reakcja

energiczniejsze przypadkowe zderzenia z otaczającymi cząsteczkami — coraz gwałtowniejsze wraz ze wzrostem temperatury.

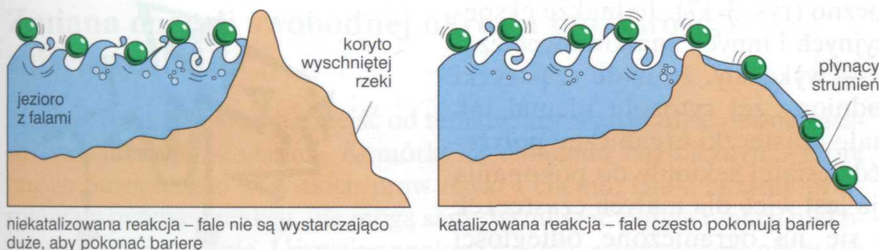
W żywych komórkach przełamanie bariery energetycznej jest znacząco wspomagane przez specjalną klasę białek — **enzymy**. Każdy enzym silnie wiąże jedną lub dwie cząsteczki, nazywane **substratami**, i przytrzymuje je w sposób bardzo obniżający energię aktywacji reakcji, której ulegają związane substraty. Substancje, które mogą obniżać energię aktywacji reakcji — **katalizatory** zwiększają szybkość reakcji chemicznej, ponieważ umożliwiają znacznie większą liczbę przypadkowych zderzeń z otaczającymi cząsteczkami, co umożliwia substratom przekroczenie bariery energetycznej, jak pokazano to na rys. 3-13. Enzymy są najbardziej efektywnymi spośród znanych katalizatorów, przyspieszając często reakcję o rząd wielkości tak duży jak 10^{14} i tym samym umożliwiają reakcje, które bez nich nie mogłyby przebiegać szybko w normalnych temperaturach.

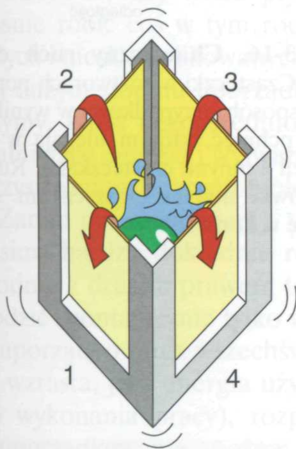
Enzymy są także wysoce selektywne. Każdy enzym katalizuje zwykle tylko jedną określoną reakcję: innymi słowy wybiórczo obniża energię aktywacji jednej z kilku możliwych reakcji chemicznych, którym ulega związany substrat. W ten sposób enzymy kierują każdą z wielu różnych cząsteczek w komórce w jej drodze po specyficznych szlakach reakcji (rys. 3-14).

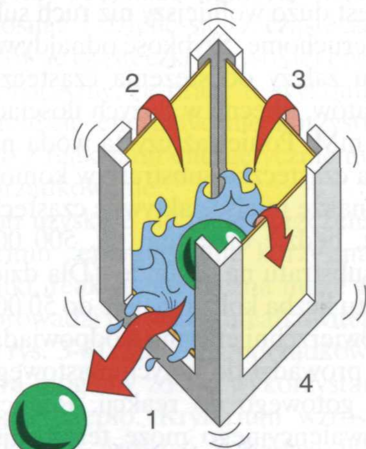
Sukces żywych organizmów przypisuje się zdolności komórki do tworzenia wielu typów enzymów, z których każdy ma precyzyjnie określone właściwości. Każdy enzym ma niepowtarzalny kształt zawierający *miejsce aktywne* — kieszeń lub zagłębienie w enzymie, do którego pasuje tylko określony substrat (rys. 3-15). Tak jak wszystkie inne katalizatory, cząsteczki enzymu pozostają po przeprowadzeniu reakcji niezmienione i dlatego mogą działać teoretycznie bez końca. W rozdziale 5, po dokładnym przyjrzeniu się molekularnej strukturze białek, omówimy bardziej szczegółowo sposób działania enzymów.

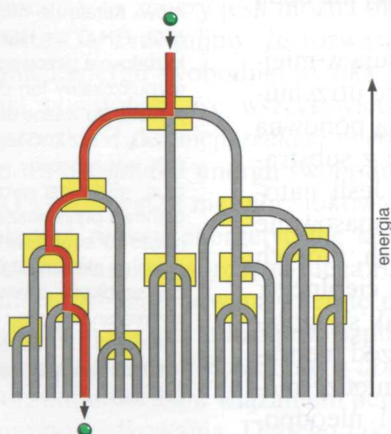
Jak enzymy odnajdują właściwe sobie substraty: znaczenie szybkiej dyfuzji

Typowy enzym katalizuje reakcję około tysiąca cząsteczek substratu w ciągu sekundy. Oznacza to, że musi być on zdolny do przyłączania nowej cząsteczki substratu w ułamku milisekundy. Jednakże zarówno enzymy jak i substraty występują w komórce we względnie małych ilościach. Jak więc potrafią odnaleźć się tak prędko? Szybkie wiązanie jest możliwe, ponieważ na poziomie molekularnym ruchy są niezwykle szybkie. Dzięki energii cieplnej cząsteczki znajdują się w ciągłym ruchu i w następstwie tego bardzo efektywnie penetrują przestrzeń wewnątrz komórki wędrując po niej — w procesie nazywanym **dyfuzją**. W ten sposób cząsteczki w komórce zderzają się z ogromną liczbą innych cząsteczek w ciągu sekundy.



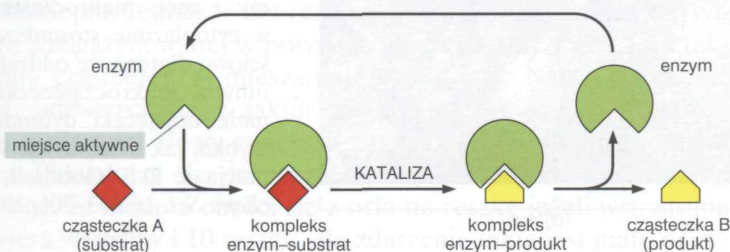






Rys. 3-14. Analogia pływających piłek z katalizą enzymatyczną. (A) Zaporę obniżono, aby przedstawić katalizę enzymatyczną. *Zielone piłki* przedstawiają potencjalny substrat enzymu (element X), który unosi się w górę i w dół na poziomach energii w wyniku stałych zderzeń z falami (analogia do cieplnego bombardowania substratu przez otaczające cząsteczki wody). Znaczne obniżenie bariery (energii aktywacji) umożliwia energetycznie korzystny ruch piłek (substratów) w dół. (B) Cztery ściany pudełka przedstawiają bariery energii aktywacji dla czterech różnych reakcji, z których wszystkie są energetycznie korzystne w tym znaczeniu, że produkty znajdują się na niższym poziomie energetycznym niż substraty. W pudełku po lewej żadna z tych reakcji nie zajdzie ponieważ nawet największe fale nie są wystarczająco duże, aby pokonać którąś z barier energetycznych. W pudełku po prawej kataliza enzymatyczna obniża energię aktywacji tylko dla reakcji 1; teraz falowanie umożliwia przejście cząsteczki tylko ponad tą barierą energetyczną, wywołując reakcję 1. (C) Rozgałęziona rzeka z grupą zapór (*żółte kwadraty*) pokazuje, jak serie reakcji katalizowanych enzymatycznie ściśle określają szlak metaboliczny, którym podąża każda cząsteczka w komórce

Ponieważ cząsteczki zderzają się i odbijają od siebie, poszczególne cząsteczki przemieszczają się raz w jedną, raz w drugą stronę, tor ich ruchu stanowi *przypadkową wędrówkę* (rys. 3-16). W czasie takiej wędrówki średnia odległość, którą pokonuje cząsteczka (w linii prostej) od punktu startu jest proporcjonalna do kwadratowego pierwiastka czasu; jeżeli jednej cząsteczce pokonanie średnio 1 μm zabiera 1 sekundę, to na pokonanie 2 μm potrzebuje ona 4 sekundy, a pokonanie 10 μm zajmie jej 100 sekund, itd.

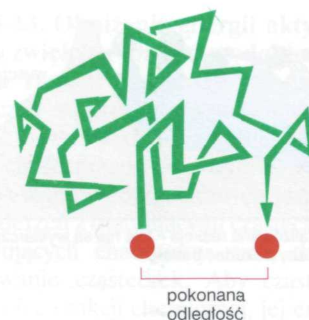


Rys. 3-15. Jak działają enzymy. Każdy enzym ma miejsce aktywne, do którego przyłączają się cząsteczki jednego lub dwu substratów, tworząc kompleks enzym–substrat. Reakcja zachodzi w miejscu aktywnym dając kompleks enzym–produkt. Produkt następnie jest uwalniany, co umożliwia enzymowi wiązanie natępnych cząsteczek substratu

Wewnątrz komórki jest bardzo tłoczno (rys. 3-17). Jednakże eksperymenty z użyciem sond fluorescencyjnych i innych znakowanych cząsteczek wstrzykniętych do komórki — wykazały, że małe cząsteczki organiczne dyfundują poprzez uwodniony żel cytozolu niemal tak szybko jak w wodzie. Na przykład małe cząsteczki organiczne potrzebują średnio tylko około jednej pięćdziesiątej sekundy do pokonania drogą dyfuzji odcinka 10 µm. Dyfuzja jest więc dla małych cząsteczek skutecznym sposobem poruszania się na ograniczone odległości w komórce.

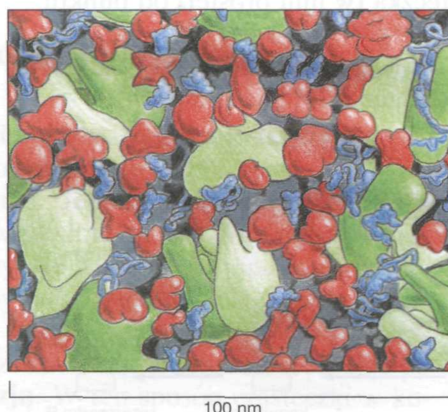
Ponieważ ruch enzymów w komórce jest dużo wolniejszy niż ruch substratów, możemy przyjąć, iż enzymy są nieruchome. Szybkość odnajdywania enzymu i jego właściwego substratu zależy od stężenia cząsteczki substratu. Na przykład niektóre z substratów, obecne w dużych ilościach w komórce, występują w stężeniach 0,5 mM. Ponieważ czysta woda ma stężenie 55 M, w przybliżeniu tylko jedna cząsteczka substratu w komórce przypada na 105 cząsteczek wody. Jednakże miejsce aktywne cząsteczki enzymu, które przyłącza ten substrat, będzie obiektem ok. 500 000 przypadkowych zderzeń z cząsteczkami substratu na sekundę. (Dla dziesięciokrotnie mniejszego stężenia substratu liczba kolizji maleje do 50 000 na sekundę itd.) Przypadkowy kontakt powierzchni enzymu z odpowiadającą powierzchnią jego substratu często prowadzi do natychmiastowego utworzenia kompleksu enzym–substrat, gotowego do reakcji. Reakcja rozerwania lub utworzenia wiązania kowalencyjnego może teraz zajść niezwykle szybko. Kiedy doceni się, jak prędko cząsteczki poruszają się i ulegają reakcji, obserwowane szybkości katalizy enzymatycznej nie będą się już wydawać aż tak niezwykłe.

Kiedy już enzym i substrat zderzą się i odpowiednio dopasują w miejscu aktywnym, tworzą między sobą wiele słabych wiązań, które utrzymują się aż do chwili, gdy przypadkowe ruchy cieplne spowodują ponowną dysocjację cząsteczek. Zazwyczaj silniejsze wiązanie enzymu z substratem spowalnia szybkość dysocjacji powstałego kompleksu. Jeśli natomiast dwie cząsteczki, które się zderzyły, mają słabo dopasowane powierzchnie, tworzy się mała ilość wiązań niekowalencyjnych, których całkowita energia nie różni się znacznie od energii ruchu cieplnego. W tym przypadku cząsteczki ulegną dysocjacji tak szybko, jak się połączyły (patrz rys. 2-28). Jest to mechanizm zabezpieczający przed nieprawidłowymi i niepożądanymi połączeniami, tworzącymi się między niedopasowanymi cząsteczkami, tak jak pomiędzy enzymem i nieodpowiednim substratem.



Rys. 3-16. Chaotyczny ruch cząsteczek. Cząsteczki w roztworach poruszają się w sposób przypadkowy w wyniku ciągłych pchnięć, którym ulegają w czasie zderzeń z innymi cząsteczkami. Ruch ten umożliwia małym cząsteczkom szybką dyfuzję w komórce

Pytanie 3-3. Enzym anhydraza węglanowa jest jednym z najszybciej działających enzymów. Katalizuje hydratację CO_2 do HCO_3^- ($CO_2 + H_2O \rightleftarrows HCO_3^- + H^+$). Szybkie przekształcenie gazowego CO_2 w znacznie lepiej rozpuszczalny jon dwuwęglanowy (HCO_3^-) jest bardzo ważne dla efektywnego transportu CO_2 przez krwioobieg — od tkanek, gdzie CO_2 jest tworzony w czasie oddychania, do płuc, gdzie jest wydychany. Anhydraza węglanowa przyspiesza reakcję 10^7 razy, uwadniając 10^5 cząsteczek CO_2 na sekundę (maksymalna aktywność). Jak sądzisz, co ogranicza szybkość działania enzymu? Naszkicuj wykres analogiczny do przedstawionego na rysunku 3-13 i wskaż, która część Twojego wykresu została zaprojektowana tak, aby pokazać 10^7 krotne przyspieszenie.



Rys. 3-17. Struktura cytoplazmy. Rysunek jest przybliżonym powiększeniem ilustrującym tłok panujący w cytoplazmie. Pokazane są tylko makrocząsteczki: RNA przedstawiono kolorem *niebieskim*, rybosomy *zielonym* a białka *czerwonym*. Enzymy i inne makrocząsteczki dyfundują w cytoplazmie stosunkowo powoli, częściowo dlatego, że oddziałują one z wielu innymi makrocząsteczkami; natomiast małe cząsteczki dyfundują prawie tak szybko, jak to się dzieje w wodzie. (Adaptacja z: D.S. Goodsell, *Trends in Biochem. Sci.* 16:203–206, 1991)

Zmiana energii swobodnej określa możliwość zajścia reakcji

Musimy teraz na moment odejść od tematu, aby wprowadzić pewne zasady obowiązujące w chemii. Komórki są układami chemicznymi, które muszą przestrzegać wszystkich praw fizyki i chemii. Choć enzymy przyspieszają przebieg reakcji, nie mogą same wymuszać zajścia reakcji niekorzystnej energetycznie. Używając analogii z wodą: enzymy same nie mogą spowodować, aby woda płynęła pod górę. Jednakże komórki muszą właśnie robić coś w tym rodzaju, aby rosnąc i dzielić się: z cząsteczek małych i nieskomplikowanych muszą budować cząsteczki o wysokiej energii i dużym stopniu uporządkowania. Zobaczymy, że pracę tę wykonują enzymy, które bezpośrednio *sprzęgają* reakcje energetycznie korzystne uwalniające energię i wytwarzające ciepło z reakcjami energetycznie niekorzystnymi tworzącymi biologiczne uporządkowanie.

Zanim przeanalizujemy, w jaki sposób uzyskuje się takie sprzężenie, musimy bardzo dokładnie rozważyć termin „energetycznie korzystna". Zgodnie z drugim prawem termodynamiki, reakcja chemiczna może zachodzić spontanicznie tylko wtedy, gdy prowadzi do wzrostu całkowitego nieuporządkowania wszechświata (patrz rys. 3-6). Stan nieuporządkowania wzrasta, jeśli energia użyteczna, która mogłaby zostać wykorzystana (do wykonania pracy), rozprasza się jako ciepło. Kryterium wzrostu nieuporządkowania można dla udogodnienia wyrażać ilościowo jako **energię swobodną** układu, *G*. Wartość *G* jest interesująca tylko wtedy, gdy układ ulega zmianie, to znaczy jeśli można określić *zmianę G*, oznaczaną jako **ΔG** (delta *G*). Przyjmijmy, że rozważany układ jest zbiorem cząsteczek. Z definicji energii swobodnej wynika, że ΔG jest miarą ilości nieuporządkowania powstałego we wszechświecie, gdy zaszła reakcja obejmująca te cząsteczki. Z definicji, *reakcjami energetycznie korzystnymi* są te, które prowadzą do spadku energii swobodnej, innymi słowy, mają *ujemną wartość* ΔG i tworzą stan nieuporządkowania (rys. 3-18).

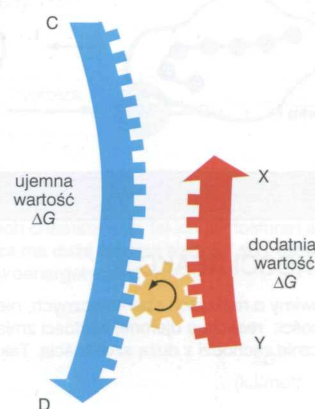
Znanym przykładem reakcji energetycznie korzystnej w skali makro jest „reakcja", w której ściśnięta sprężyna ulega rozluźnieniu do normalnego stanu, uwalniając zmagazynowaną energię potencjalną jako ciepło do otoczenia; przykładem w skali mikro jest rozpuszczanie soli w wodzie. Natomiast *reakcje energetycznie niekorzystne o dodatniej wartości* ΔG — takie jak łączenie się aminokwasów wiązaniem peptydowym — tworzą we wszechświecie stan uporządkowania. Dlatego takie reakcje mogą zachodzić tylko wówczas, gdy są sprzężone z inną reakcją, mającą tak dużą ujemną wartość ΔG, że ΔG całego procesu jest ujemna (rys. 3-19). Pojęcia te zebrano (z przykładami) w panelu 3-1 (s. 90–91).



Rys. 3-18. Różnice między reakcją energetycznie korzystną a energetycznie niekorzystną.

Wartość ΔG zależy od stężenia reaktantów

Jak właśnie opisaliśmy, reakcja A $\rightleftarrows$ B zajdzie w kierunku A $\rightarrow$ B jeżeli związana zmiana energii swobodnej, ΔG, jest ujemna — tak jak napięta sprężyna, puszczona rozpręża się i rozprasza zgromadzoną energię do otoczenia jako ciepło. Jednakże dla reakcji chemicznej ΔG zależy nie tylko od energii zmagazynowanej w poszczególnych cząsteczkach, lecz także od stężenia cząsteczek w mieszaninie reakcyjnej. Należy pamiętać o tym, że ΔG odzwierciedla, w jakim stopniu reakcja zwiększa nieuporządkowanie — innymi słowy zwiększa prawdopodobieństwo — stanu wszechświata. Odwołując się do naszej analogii z monetą, jest bardzo prawdopodobne, że moneta obróci się z orła na reszkę jeżeli wstrząsane pudełko zawiera 90 orłów i 10 reszek, ale zdarzenie takie jest mało praw-

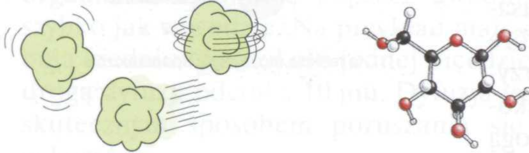


Energetycznie niekorzystna reakcja Y → X jest wymuszana przez energetycznie korzystną reakcję C → D, ponieważ zmiana energii swobodnej pary reakcji sprzężonych jest mniejsza od zera

Rys. 3-19. Jak sprzężenie reakcji może wymuszać przebieg reakcji energetycznie niekorzystnej

ENERGIA SWOBODNA

Cząsteczki żywej komórki mają energię wynikającą z drgań, obrotów i przemieszczania się oraz energię zmagazynowaną w wiązaniach między poszczególnymi atomami



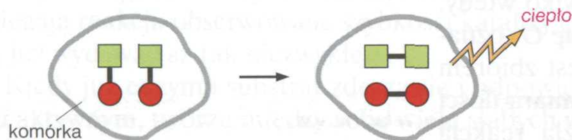
Energia swobodna (*G*) jest miarą tej energii cząsteczki, która może być w zasadzie wykorzystana do wykonania użytecznej pracy w stałej temperaturze (jak w żywej komórce). *G* wyraża się w kilokaloriach na mol lub kilodżulach na mol

1 kJ = 0,239 kcal/mol
1 kcal = 4,18 kJ/mol

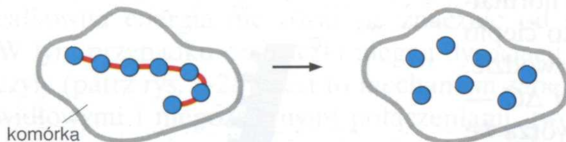
REAKCJE WYWOŁUJĄ NIEUPORZĄDKOWANIE

Pomyśl o reakcji chemicznej zachodzącej w wyizolowanej komórce w stałej temperaturze bez zmiany objętości. Reakcja ta może zwiększać stan nieuporządkowania w dwojaki sposób:

1 Zmiany energii wiązania reagujących cząsteczek mogą powodować uwalnianie ciepła, które zwiększa nieuporządkowanie środowiska

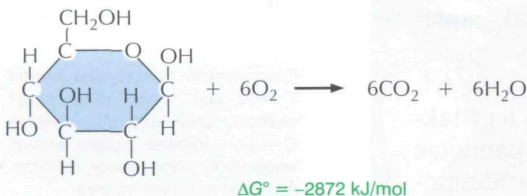


2 Reakcja może zmniejszać stopień uporządkowania reagujących cząsteczek, np. zrywając długie łańcuchy cząsteczek lub przerywając interakcje zapobiegające rotacji wiązań



SZYBKOŚCI REAKCJI

Kiedy mówimy o reakcjach spontanicznych, nie bierzemy pod uwagę czasu lub szybkości: reakcja o ujemnej wartości zmiany energii swobodnej (ΔG) niekoniecznie zachodzi z dużą szybkością. Tak więc dla spalania glukozy w tlenie



$\Delta G° = -2872$ kJ/mol

Ale nawet ta bardzo korzystna reakcja może nie zajść przez stulecia, jeśli nie będzie enzymów przyspieszających ten proces. Natomiast enzymy są zdolne do katalizowania reakcji i zwiększania ich szybkości, ale nie mogą zmieniać $\Delta G°$ reakcji

ΔG („DELTA G")

Zmiany swobodnej energii reakcji oznacza się przez ΔG, gdzie „Δ" wskazuje różnicę. Stąd dla reakcji



ΔG = energia swobodna (C + D) minus energia swobodna (A + B)

ΔG według definicji jest miarą ilości nieuporządkowania wywołanego przez reakcję: zmiana uporządkowania *wewnątrz* komórki spowodowana przez reakcję *plus* zmiana uporządkowania *otoczenia* wywołana uwolnieniem ciepła.

ΔG jest użyteczna dla biochemików, gdyż określa, jak daleko od stanu równowagi znajduje się reakcja. Stąd reakcja



ma dużą ujemną wartość ΔG, ponieważ komórka utrzymuje reakcję z daleka od stanu równowagi, ciągle tworząc nowy ATP. Jednak jeżeli komórka umiera, to większość jej ATP ulega hydrolizie aż do osiągnięcia równowagi, a wtedy $\Delta G = 0$. W tym punkcie reakcje wprost i w kierunku odwrotnym przebiegają z równymi szybkościami, tak więc dalsze zmiany nie zachodzą

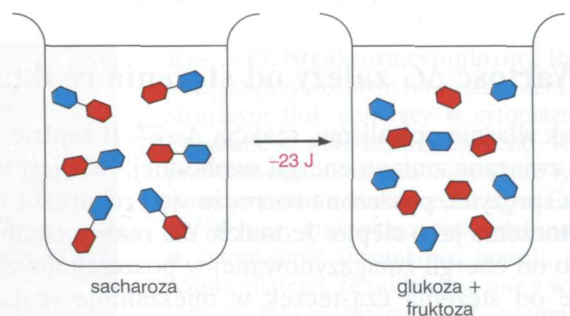
REAKCJE SPONTANICZNE

Z drugiego prawa termodynamiki wynika, że stan nieuporządkowania wszechświata może tylko wzrastać (patrz s. 79). Zmiana energii swobodnej, ΔG, określa zmianę uporządkowania spowodowaną przez reakcję i jest zdefiniowana w ten sposób, że ΔG ma wartość *ujemną*, jeżeli nieuporządkowanie wszechświata (reakcja plus otoczenie) *wzrasta*.

Innymi słowy reakcja chemiczna, która zachodzi spontanicznie musi mieć ujemną wartość ΔG

$$G_{\text{produktów}} - G_{\text{substratów}} = \Delta G < 0$$

PRZYKŁAD: różnica energii swobodnej między próbką 100 ml 10 mM sacharozy (zwykły cukier) a próbką 100 ml 10 mM glukozy plus 10 mM fruktozy wynosi ok. − 23,0 dżuli. Dlatego reakcja hydrolizy (sacharoza → glukoza + fruktoza) może zachodzić spontanicznie



Natomiast reakcja odwrotna (glukoza + fruktoza → sacharoza), której ΔG wynosi +23 dżule, nie może zajść bez dostarczenia energii z reakcji sprzężonej (patrz strona sąsiednia)

PRZEWIDYWANIE REAKCJI

W celu określenia wyniku reakcji (czy zajdzie ona w prawo czy w lewo? W jakim miejscu się zatrzyma?) musimy zmierzyć jej standardową zmianę energii swobodnej (ΔG°).
Wielkość ta przedstawia zysk lub stratę energii swobodnej przy przekształceniu jednego mola substratu w jeden mol produktu w „standardowych warunkach" (wszystkie cząsteczki występują w stężeniach 1M, a pH wynosi 7,0)

ΔG° niektórych reakcji

(siła napędowa)

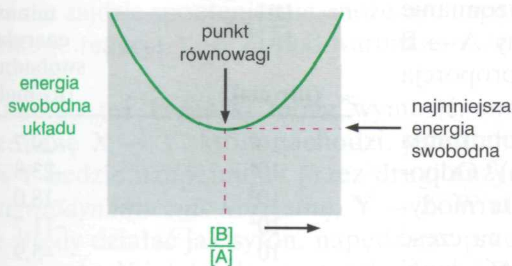
glukozo-1-P → glukozo-6-P	−7,3 kJ/mol
sacharoza → glukoza + fruktoza	−23 kJ/mol
ATP → ADP + P_i	−30,5 kJ/mol
glukoza + $6O_2$ → $6CO_2$ + $6H_2O$	−2872 kJ/mol

RÓWNOWAGA CHEMICZNA

Istnieje ustalona zależność między standardową zmianą energii swobodnej reakcji, ΔG°, a stałą równowagi, K, tej reakcji. Na przykład, odwracalna reakcja



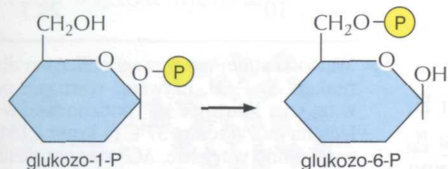
będzie zachodzić aż do chwili, gdy stosunek stężeń [B]/[A] będzie równy K (zauważ: używamy nawiasów kwadratowych [ ] aby oznaczyć stężenie). W tym punkcie energia swobodna układu będzie mieć najmniejszą wartość



$$\Delta G^\circ = -5{,}69 \log_{10} K$$

$$K = 10^{-\Delta G^\circ/5{,}69}$$

Na przykład dla reakcji



ΔG° = −7,3 kJ/mol. Stąd jej stała równowagi wynosi

$$K = 10^{(7{,}3/5{,}69)} = 10^{(1{,}28)} = 19$$

Tak więc reakcja osiągnie stan równowagi, gdy

[glukozo-6-P]/[glukozo-1-P] = 19

REAKCJE SPRZĘŻONE

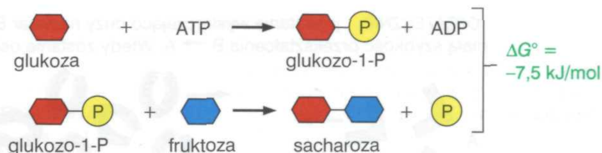
Reakcje mogą być sprzężone ze sobą, jeżeli mają jeden lub więcej wspólnych intermediatów (produktów pośrednich). W tym przypadku całkowita zmiana energii swobodnej jest po prostu sumą poszczególnych wartości ΔG°. Reakcja, która jest niekorzystna energetycznie (dodatnia wartość ΔG°), może być napędzana przez drugą reakcję, bardzo korzystną energetycznie

POJEDYNCZA REAKCJA



WYNIK NETTO: reakcja nie zajdzie !

SPRZĘŻONE REAKCJE



WYNIK NETTO: sacharoza wytworzona w reakcji napędzanej hydrolizą ATP

WIĄZANIA „WYSOKOENERGETYCZNE"

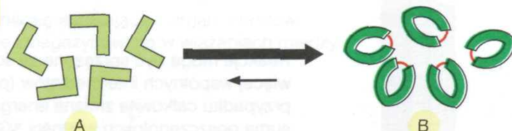
Jedną z najczęstszych reakcji w komórce jest hydroliza, polegająca na rozszczepianiu kowalencyjnego wiązania w wyniku dodania wody

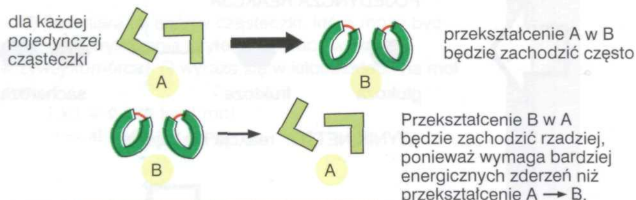


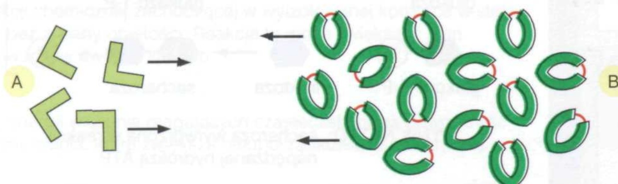
ΔG° dla tej reakcji jest czasem potocznie określana jako „energia wiązania". O związkach chemicznych, takich jak fosforan acetylu i ATP, których hydroliza ma dużą ujemną wartość ΔG°, mówi się, że mają wiązanie „wysokoenergetyczne".

	ΔG° (kJ/mol)
acetylo P → octan + P_i	−43,1
ATP → ADP + P_i	−30,5
glukozo-6-P → glukoza + P_i	−13,8

(Zauważ, że dla uproszczenia w powyższych równaniach pominięto wodę)







Rys. 3-20. Równowaga chemiczna. Gdy reakcja osiąga stan równowagi, przepływ reagujących cząsteczek w kierunku wprost (w prawo) i odwrotnym (w lewo) jest równy i przeciwstawny

dopodobne gdy pudełko zawiera 10 orłów i 90 reszek. Z dokładnie takiej samej przyczyny odwracalna reakcja A $\rightleftarrows$ B, przy dużym nadmiarze A w stosunku do B będzie miała tendencję do zachodzenia w kierunku A → B; innymi słowy wystąpi tendencja, aby liczba cząsteczek ulegających przemianie A → B była większa niż cząsteczek ulegających przemianie B → A. Stąd ΔG staje się tym bardziej ujemna dla przemiany A → B (a bardziej dodatnia dla przemiany B → A), im większa jest proporcja A do B.

Jakiej różnicy stężeń potrzeba do skompensowania danego obniżenia energii wiązań chemicznych (i towarzyszącego uwalniania ciepła)? Odpowiedź nie jest prosta, ale można ją uzyskać na podstawie analizy termodynamicznej, która pozwala podzielić zmianę energii swobodnej na część zależną od stężenia i część niezależną od niego. W ten sposób ΔG danej reakcji można zapisać jako sumę dwóch części: pierwsza, nazywana *standardową zmianą energii swobodnej*, $\Delta G°$, zależy od wewnętrznych właściwości reagujących cząsteczek, druga — od ich stężenia. Dla prostej reakcji A→B w temp. 37°C

$$\Delta G = \Delta G° + 2{,}578 \ln \frac{[B]}{[A]}$$

gdzie: ΔG jest wyrażana w kilodżulach na mol, [A] i [B] — stężenia A i B, 2,578 — stała, ln — logarytm naturalny.

Należy zauważyć, że ΔG jest równa wartości $\Delta G°$, gdy stężenia molowe A i B są równe (ln 1 = 0). Jak można się spodziewać, ΔG staje się bardziej ujemna, jeśli stosunek B do A maleje (ln liczby < 1 jest ujemny).

Stan równowagi chemicznej zostaje osiągnięty, gdy wpływ stężenia dokładnie równoważy tendencję nadaną reakcji przez $\Delta G°$, wtedy energia swobodna netto nie ulega zmianie i reakcja nie może przebiegać w żadnym

Tabela 3-1. Zależność między zmianą energii swobodnej a stałą równowagi

Stała równowagi $\frac{[B]}{[A]} = K$ (litr/mol)	Energia swobodna B minus energia swobodna A (kJ/mol)
10^5	−29,7
10^4	−23,8
10^3	−18,0
10^2	−11,7
10	−5,9
1	0
10^{-1}	5,9
10^{-2}	11,7
10^{-3}	18,0
10^{-4}	23,8
10^{-5}	29,7

Wartości stałej równowagi obliczono dla prostej reakcji A $\rightleftarrows$ B, używając równania podanego w tekście. Wartości $\Delta G°$ podano tutaj w kilodżulach na mol w temp. 37°C (1 kcal=4,184 kJ). Jak wyjaśniono w tekście, $\Delta G°$ stanowi różnicę energii swobodnych w warunkach standardowych (gdzie wszystkie składniki są obecne w stężeniu 1,0 mol/litr). Z tabeli tej wynika, że gdy zmiana energii swobodnej dla przekształcenia A → B jest korzystna i wynosi −18 kJ/mol, wtedy 1000 razy więcej cząsteczek będzie w stanie B niż w stanie A.

kierunku (rys. 3-20). Wówczas $\Delta G = 0$, i stąd stężenia A i B są takie, że

$$-2{,}578 \ln \frac{[B]}{[A]} = \Delta G^\circ$$

co oznacza, że równowaga chemiczna w 37°C zostanie osiągnięta, gdy

$$\frac{[B]}{[A]} = e^{-\Delta G^\circ/2{,}578}$$

W tabeli 3-1 pokazano, jak stosunek stężeń A do B w stanie równowagi (wyrażony jako stała równowagi, *K*) zależy od wartości ΔG°.

Należy uświadomić sobie, że jeśli enzym (lub katalizator) obniża energię aktywacji dla reakcji A → B, to obniża on także energię aktywacji dla reakcji B → A dokładnie o tę samą wartość (patrz rys. 3-12). Reakcje wprost i w kierunku odwrotnym będą w ten sposób przyspieszane przez enzym o ten sam rząd wielkości, a stała równowagi (i ΔG°) dla reakcji pozostanie niezmieniona (rys. 3-21).

Pytanie 3-4. Rozpatrzmy ponownie analogię z potrząsanym pudełkiem zawierającym monety, którą omówiono w tekście. Reakcję — podskakiwanie monet obracających się orłem (O) lub reszką (R) do góry opisuje równanie O ⇄ R.

A. Czym są ΔG i ΔG° w tej analogii?

B. Co odpowiada temperaturze, w której zachodzi reakcja? Co odpowiada energii aktywacji reakcji? Załóżmy, że masz „enzym" zwany „potrząsaczem", który katalizuje tę reakcję. Co może być efektem działania „potrząsacza" i co, mechanicznie, może „potrząsacz" wykonywać w tej analogii?

Dla ciągu reakcji wartości ΔG° są addytywne

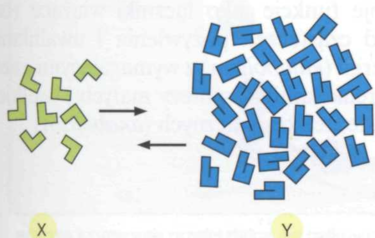
Przebieg większości reakcji można przewidywać ilościowo. Zgromadzenie dużej ilości danych termodynamicznych umożliwiło obliczenie standardowych zmian energii swobodnej, ΔG°, dla większości ważnych reakcji metabolicznych w komórce. Całkowita zmiana energii swobodnej dla szlaku metabolicznego jest więc po prostu sumą zmian energii swobodnych w jego każdym elemencie składowym. Rozpatrzmy na przykład sekwencję dwóch reakcji

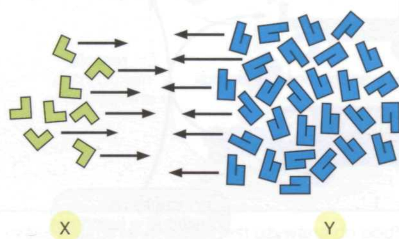


$$X \rightarrow Y \text{ i } Y \rightarrow Z$$

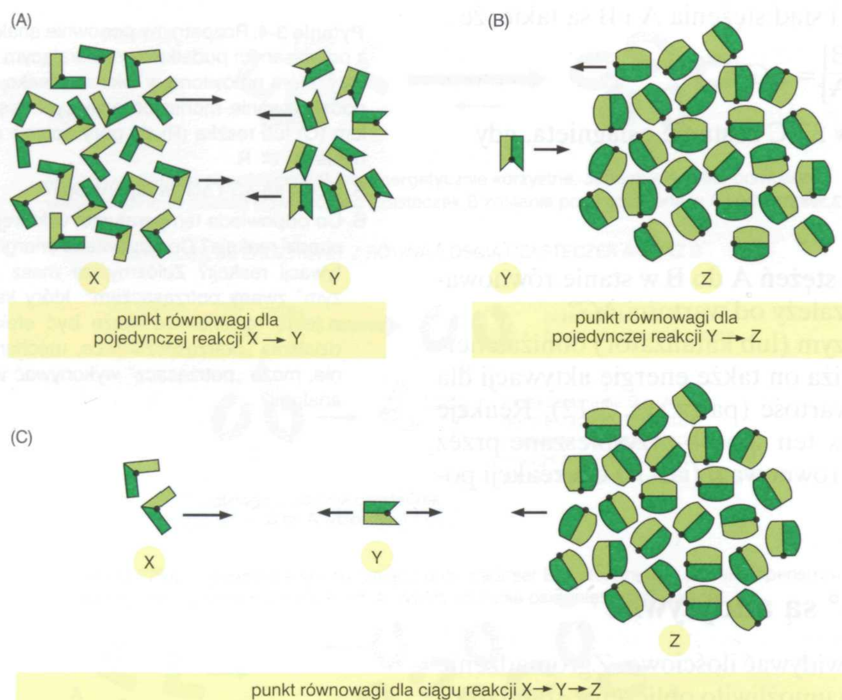
gdzie wartości ΔG° wynoszą odpowiednio +20,9 i –54,3 kJ/mol. (Przypomnijmy, że mol jest ilością substancji wynoszącą $6 \cdot 10^{23}$ cząsteczek). Jeżeli te dwie reakcje zajdą kolejno, ΔG° dla sprzężonych reakcji wyniesie -33,4 kJ/mol. Tak więc niekorzystna termodynamicznie reakcja X → Y, która nie zajdzie spontanicznie, może być napędzana korzystną termodynamicznie reakcją Y → Z, pod warunkiem, że druga reakcja nastąpi po pierwszej.

Dlatego też komórki mogą wymusić energetycznie niekorzystną przemianę X → Y, która zachodzi, jeżeli enzym katalizujący reakcję X → Y będzie uzupełniony przez drugi enzym, który katalizuje reakcję *termodynamicznie korzystną,* Y → Z. W efekcie reakcja Y → Z będzie wtedy działać jak syfon, napędzając przekształcenie cząsteczki X w cząsteczkę Y i dalej do cząsteczki Z (rys. 3-22). Na przykład niektóre reakcje w długim szlaku przekształcającym cukry do CO_2 i H_2O są termodynamicznie niekorzystne. Mimo to szlak przebiega jednak szybko do końca, ponieważ całkowita ΔG° szeregu kolejnych reakcji ma dużą wartość ujemną.





Rys. 3-21. Enzymy nie mogą zmieniać punktu równowagi reakcji. Enzymy, podobnie jak inne katalizatory, przyspieszają szybkość reakcji w kierunku wprost (w prawo) i odwrotnym (w lewo) o tę samą wartość. Dlatego dla pokazanych tu reakcji, zarówno katalizowanej jak i niekatalizowanej, liczba cząsteczek podlegających przekształceniu X → Y jest równa liczbie cząsteczek ulegających przekształceniu Y → X, gdy proporcja cząsteczek Y do X wynosi 3,5:1. Innymi słowy, dwie reakcje osiągają stan równowagi dokładnie w tym samym punkcie



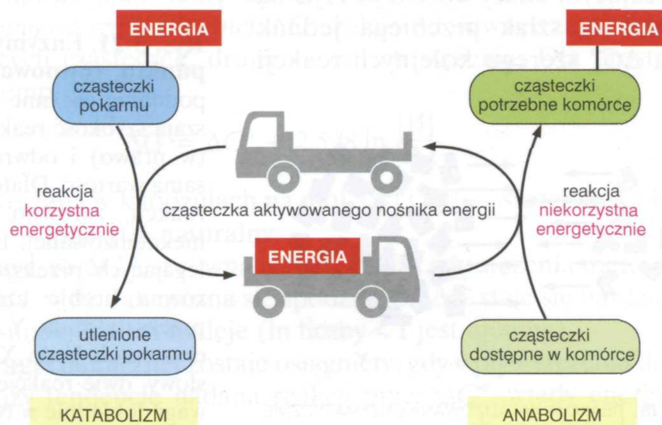
Rys. 3-22. Jak reakcja energetycznie niekorzystna może być wymuszana przez drugą, następującą po niej reakcję. (A) W stanie równowagi cząsteczek X jest dwukrotnie więcej niż cząsteczek Y, ponieważ X ma mniejszą energię niż Y. (B) W stanie równowagi cząsteczek Z jest 25 razy więcej niż cząsteczek Y, ponieważ Z *ma mniejszą energię niż* Y. (C) Jeżeli reakcje w (A) i (B) są sprzężone, prawie wszystkie cząsteczki X będą przekształcone w cząsteczki Z.

Pytanie 3-5. Obejrzyj dokładnie rysunek 3-22. Naszkicuj schemat zmian energii podobny do tego z rys. 3-12 dla dwóch reakcji osobno oraz dla reakcji połączonych. Zaznacz na wykresie zmiany standardowej energii swobodnej dla reakcji X → Y, Y → Z oraz X → Z. Pokaż, jak enzymy katalizujące te reakcje mogą zmieniać ten schemat.

Jednakże tworzenie szlaków sekwencyjnych w wielu przypadkach nie jest korzystne. Często dany szlak jest prostą reakcją X → Y bez dodatkowych przekształceń Y w jakiś inny produkt. Na szczęście istnieje wiele innych zasadniczych sposobów wykorzystania enzymów do sprzęgania reakcji. Omówimy je w kolejnym podrozdziale.

Cząsteczki aktywowanych nośników a reakcje biosyntezy

Energia uwalniana w czasie utleniania cząsteczek pokarmu musi być czasowo magazynowana, zanim może być skierowana do konstruowania potrzebnych komórce innych małych cząsteczek organicznych oraz większych i bardziej skomplikowanych cząsteczek. W większości przypadków energia jest przechowywana jako energia wiązań chemicznych przez niewielką grupę aktywowanych cząsteczek nośników, które w formie zaktywowanej zawierają przynajmniej jedno „wysokoenergetyczne"



Rys. 3-23. Przenoszenie energii i rola aktywowanych nośników w metabolizmie. Służąc jako energetyczne wahadła, aktywowane cząsteczki nośników spełniają swoje funkcje jako łączniki wiążące rozkład cząsteczek pożywienia i uwalnianie energii (*katabolizm*) z wymagającymi energii reakcjami biosyntezy małych i wielkich cząsteczek organicznych (*anabolizm*)

wiązanie kowalencyjne. Cząsteczki te dyfundują bardzo szybko w obrębie całej komórki i w ten sposób przenoszą energię swych wiązań z miejsc uzyskiwania energii do miejsc, gdzie energia jest potrzebna do reakcji biosyntez oraz innych form aktywności komórki (rys. 3-23).

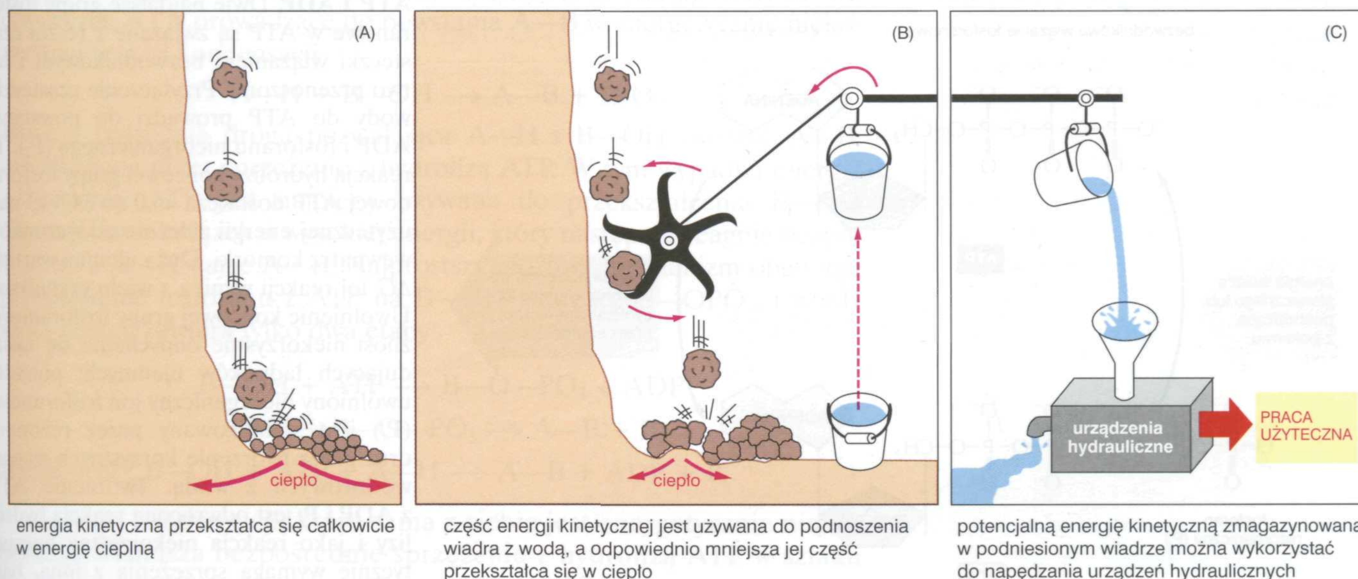
Zaktywowane nośniki przechowują energię w łatwo wymienialnej postaci, zarówno jako łatwe do przeniesienia grupy chemiczne jak i w formie elektronów o wysokiej energii, oraz mogą służyć w podwójnej roli: jako źródło energii grup chemicznych w reakcjach biosyntezy. Z przyczyn historycznych cząsteczki te są także czasami nazywane *koenzymami*. Najważniejszymi cząsteczkami zaktywowanych nośników są ATP i dwie cząsteczki blisko ze sobą spokrewnione — NADH i NADPH, co wkrótce omówimy szczegółowo. Powinniśmy zobaczyć, że komórki używają cząsteczek zaktywowanych nośników jak pieniędzy do płacenia za reakcje, które w przeciwnym wypadku nie mogłyby zachodzić.

Powstawanie zaktywowanych nośników energii jest sprzężone z reakcją energetycznie korzystną

Kiedy cząsteczka pokarmu, taka jak glukoza, jest utleniana w komórce, reakcje katalizowane przez enzymy pozwalają przechwycić w postaci użytecznej chemicznie większą część energii, która uwalnia się podczas utleniania, nie dopuszczają do rozrzutnego rozproszenia jej w postaci ciepła. Umożliwiają to **reakcje sprzężone**, w których reakcja energetycznie korzystna zostaje wykorzystana do napędzania energetycznie niekorzystnej, aktywując cząsteczki nośników lub magazynując energię w innej postaci. Mechanizmy sprzężenia wymagają udziału enzymów i są podstawą wszystkich przekształceń energii w komórce.

Istotę sprzężenia reakcji przedstawiono na rys. 3-24 w postaci analogii mechanicznej, w której reakcję korzystną energetycznie stanowi spadanie skały z urwiska. Energia spadających skał zostałaby normalnie zmarnowana w postaci ciepła powstającego w wyniku tarcia skały uderzającej o ziemię (patrz rys. 3-7, schemat przedstawiający spadające cegły). Można jednak część tej energii użyć do napędzania koła łopatkowego, które będzie dźwigać w górę wiadra z wodą (rys. 3-24B). Ponieważ skały mogą teraz osiągnąć ziemię tylko pokonując koło łopatkowe, mówimy, że energetycznie korzystna

Rys. 3-24. Mechaniczny model ilustrujący zasadę sprzężenia reakcji chemicznych. Spontaniczny proces pokazany na rysunku (A) może służyć jako analogia bezpośredniego utleniania glukozy do CO_2 i H_2O, które wytwarza tylko ciepło. Na rysunku (B) ten sam proces jest sprzężony z innym procesem; ten drugi proces może służyć jako analogia aktywacji cząsteczek nośników. Energia uwalniana w (B) jest w formie bardziej użytecznej niż w (A) i może być użyta do napędzania różnorodnych reakcji energetycznie niekorzystnych (C)



energia kinetyczna przekształca się całkowicie w energię cieplną

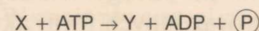
część energii kinetycznej jest używana do podnoszenia wiadra z wodą, a odpowiednio mniejsza jej część przekształca się w ciepło

potencjalną energię kinetyczną zmagazynowaną w podniesionym wiadrze można wykorzystać do napędzania urządzeń hydraulicznych

reakcja spadania skał jest bezpośrednio *sprzężona* z energetycznie niekorzystną reakcją podnoszenia wiader z wodą. Ponieważ jednak w (B) część energii jest zużyta do pracy, skały uderzają o ziemię z dużo mniejszą prędkością niż w (A), i odpowiednio mniej energii rozprasza się w formie ciepła.

Bardzo podobne procesy zachodzą w komórkach, gdzie enzymy grają rolę koła łopatkowego z naszej analogii. Dzięki mechanizmowi, który omówiono w rozdz. 4, sprzęgają one reakcję energetycznie korzystną, taką jak utlenianie cząsteczek pokarmu, z reakcją energetycznie niekorzystną, np. tworzenia cząsteczki zaktywowanego nośnika. W rezultacie ilość ciepła uwalnianego w reakcjach utleniania ulega zmniejszeniu właśnie o ilość energii, która zostaje zmagazynowana w „wysokoenergetycznych" wiązaniach kowalencyjnych cząsteczki zaktywowanego nośnika. Z kolei cząsteczka zaktywowanego nośnika pobiera pakiet energii wystarczający do zasilania reakcji chemicznych gdziekolwiek w komórce.

Pytanie 3-6. Użyj rysunku 3-24B do zilustrowania następującej reakcji napędzanej hydrolizą ATP.



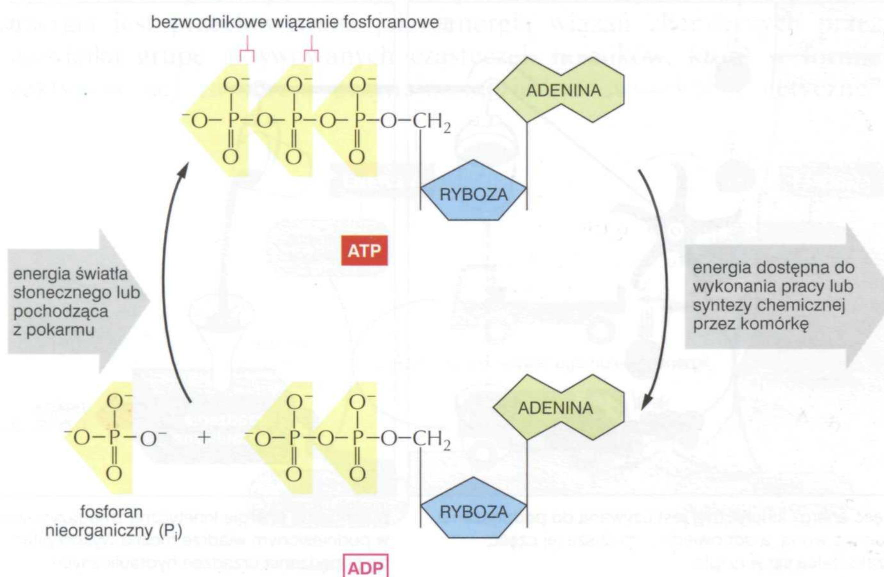
A. Która cząsteczka lub cząsteczki są w tym wypadku analogami a) skał na szczycie urwiska, b) rumowiska skalnego u stóp urwiska, c) wiadra w jego najwyższym położeniu, d) wiadra na ziemi?

B. Co będzie analogią do a) skał uderzających o ziemię bez koła łopatkowego (rys. 3-24A) i b) maszyny hydraulicznej (rys. 3-24C)?

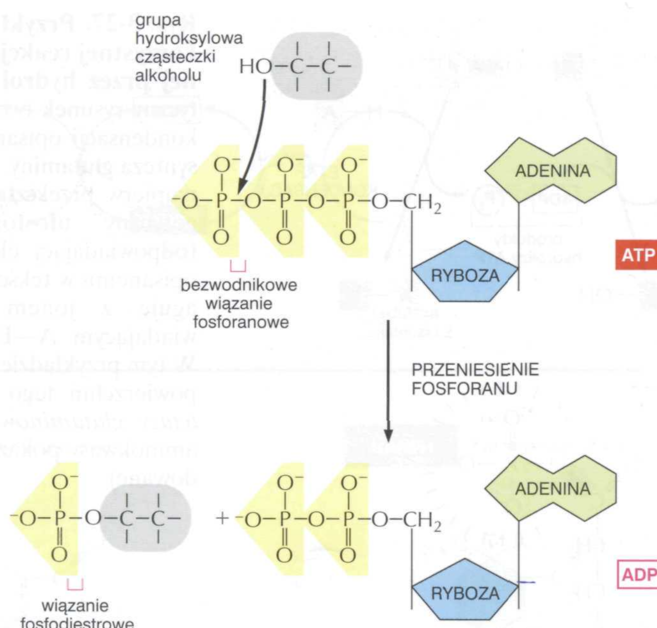
ATP jest zaktywowanym nośnikiem najczęściej wykorzystywanym w komórce

Najważniejszym i najbardziej uniwersalnym spośród zaktywowanych nośników w komórkach jest **ATP** (adenozyno-5'-trifosforan). Podobnie jak energii zmagazynowanej w podnoszonym wiadrze z wodą (rys. 3-24B) można użyć do napędzania do wielu różnych urządzeń hydraulicznych, tak ATP stanowi wygodny i wszechstronny magazyn energii (coś w rodzaju pieniędzy) do zasilania różnorodnych reakcji chemicznych w komórce. Jak pokazano na rys. 3-25, ATP jest syntetyzowany w energetycznie niekorzystnej reakcji fosforylacji, polegającej na przyłączeniu grupy fosforanowej do **ADP** (adenozyno-5'-difosforanu). Kiedy jest to potrzebne, ATP oddaje swój pakiet energii — cząsteczkę nieorganicznego fosforanu, którą może uwalniać w energetycznie korzystnej reakcji hydrolizy ATP do ADP. Odzyskany ADP może zostać wykorzystany w następnym cyklu reakcji do fosforylacji tworzącej ATP.

Energetycznie korzystna reakcja hydrolizy ATP jest sprzężona z wielu innymi niekorzystnymi energetycznie reakcjami syntezy różnych cząsteczek. Niektóre z tych reakcji spotkamy w dalszej części rozdziału. Wiele z nich obejmuje przeniesienie końcowego fosforanu ATP na inną cząsteczkę, jak pokazano na przykładzie reakcji fosforylacji na rys. 3-26.



Rys. 3-25. Wzajemne przekształcenia ATP i ADP. Dwie najdalsze grupy fosforanowe w ATP są związane z resztą cząsteczki wiązaniem bezwodnikowym i łatwo przenoszone. Przyłączenie cząsteczki wody do ATP prowadzi do powstania ADP i fosforanu nieorganicznego (P_i). Ta reakcja hydrolizy końcowej grupy fosforanowej ATP dostarcza 46,0 do 54,4 kJ/mol użytecznej energii zależnie od warunków wewnątrz komórki. Duża ujemna wartość ΔG tej reakcji wynika z wielu czynników. Uwolnienie końcowej grupy fosforanowej znosi niekorzystne odpychanie się sąsiadujących ładunków ujemnych; ponadto uwolniony nieorganiczny jon fosforanowy (P_i) jest stabilizowany przez rezonans oraz przez tworzenie korzystnych wiązań wodorowych z wodą. Tworzenie ATP z ADP i P_i jest odwróconą reakcją hydrolizy i jako reakcja niekorzystna energetycznie wymaga sprzężenia z inną, bardziej korzystną energetycznie



Rys. 3-26. Przykład reakcji przeniesienia fosforanu. Ponieważ „wysokoenergetyczne" wiązanie bezwodnikowe w ATP jest przekształcane w wiązanie fosfodiestrowe, reakcja ta jest korzystna energetycznie i ma dużą ujemną wartość ΔG. Reakcje tego typu biorą udział w syntezie fosfolipidów i w początkowych etapach reakcji katabolizmu cukrów

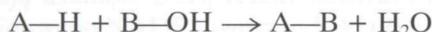
ATP jest najliczniej występującym zaktywowanym nośnikiem energii w komórkach. Służy m. in. jako źródło energii dla wielu pomp transportujących substancje pomiędzy komórką i otoczeniem (rozdz. 12); zasila także motory molekularne, które umożliwiają komórkom mięśniowym skurcz, a komórkom nerwowym transportowanie materiałów wzdłuż ich długich aksonów (rozdz. 16).

Pytanie 3-7. Bezwodnikowe wiązanie fosforanowe, które w ATP wiąże dwie grupy fosforanowe wiązaniem „wysokoenergetycznym", ma $\Delta G°$ wynoszące -30,5 kJ/mol. Hydroliza tego wiązania uwalnia 46,0 do 54,0 kJ/mol użytecznej energii. Jak to możliwe? Jak myślisz dlaczego podaje się tu zakres energii, a nie dokładną wartość jak dla $\Delta G°$?

Energia magazynowana w ATP jest często wykorzystywana do łączenia dwóch cząsteczek

Poprzednio omówiliśmy jeden ze sposobów sprzężenia reakcji energetycznie korzystnej z reakcją energetycznie niekorzystną, X → Y, tak aby umożliwić przebieg tej ostatniej. W schemacie przedstawionym na rys. 3-22 drugi enzym katalizuje reakcję korzystną energetycznie Y → Z, przekształcając w tym procesie cały X w Y. Kiedy jednak potrzebnym produktem jest Y, a nie Z, mechanizm ten nie jest użyteczny.

Częstym typem reakcji potrzebnej do biosyntezy jest łączenie dwóch cząsteczek A i B prowadzące do powstania A—B w energetycznie niekorzystnej reakcji kondensacji



$$A\text{—}H + B\text{—}OH \longrightarrow A\text{—}B + H_2O$$

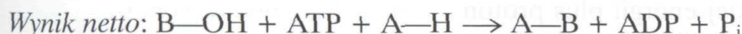
Istnieje pośrednia droga pozwalająca A—H i B—OH tworzyć A—B, umożliwiona przez sprzężenie z hydrolizą ATP. W tym wypadku energia z hydrolizy ATP jest najpierw używana do przekształcenia B—OH w przejściowy związek o wysokiej energii, który następnie reaguje bezpośrednio z A—H dając A—B. Najprostszy możliwy mechanizm obejmuje przeniesienie fosforanu z ATP na B—OH tworzące B—OPO_3, i wtedy szlak reakcji zawiera tylko dwa etapy:



$$B\text{—}OH + ATP \longrightarrow B\text{—}O\text{—}PO_3 + ADP$$

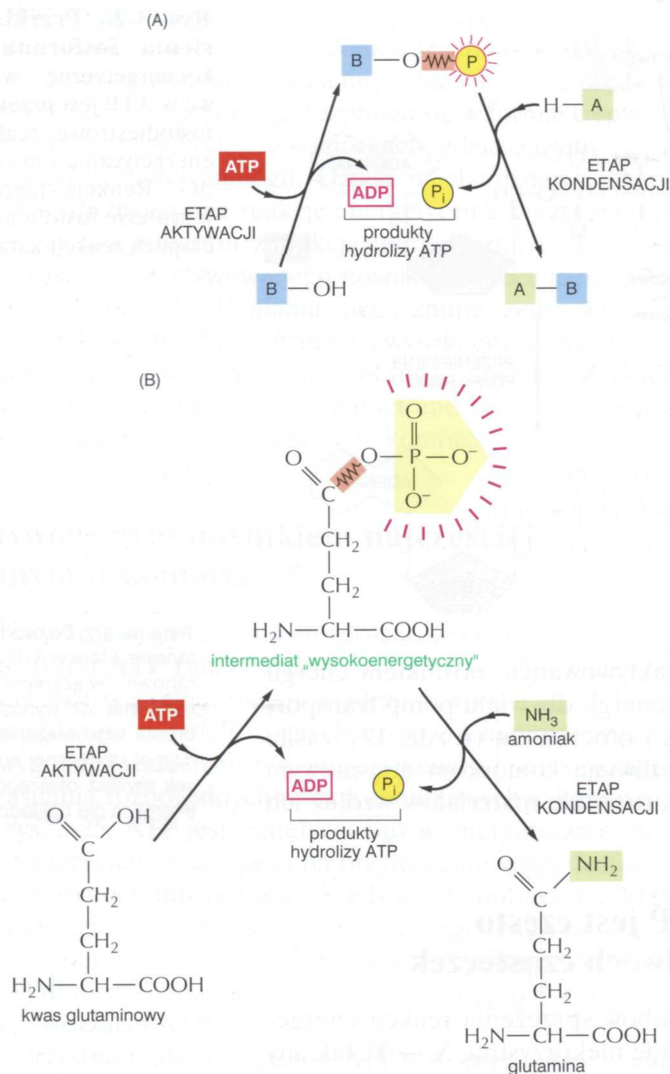


$$A\text{—}H + B\text{—}O\text{—}PO_3 \longrightarrow A\text{—}B + P_i$$



Wynik netto: $B\text{—}OH + ATP + A\text{—}H \longrightarrow A\text{—}B + ADP + P_i$

Reakcję kondensacji, która sama z siebie jest energetycznie niekorzystna, wymusza bezpośrednie sprzężenie z hydrolizą ATP w szlaku reakcji katalizowanych enzymatycznie (rys. 3-27A).

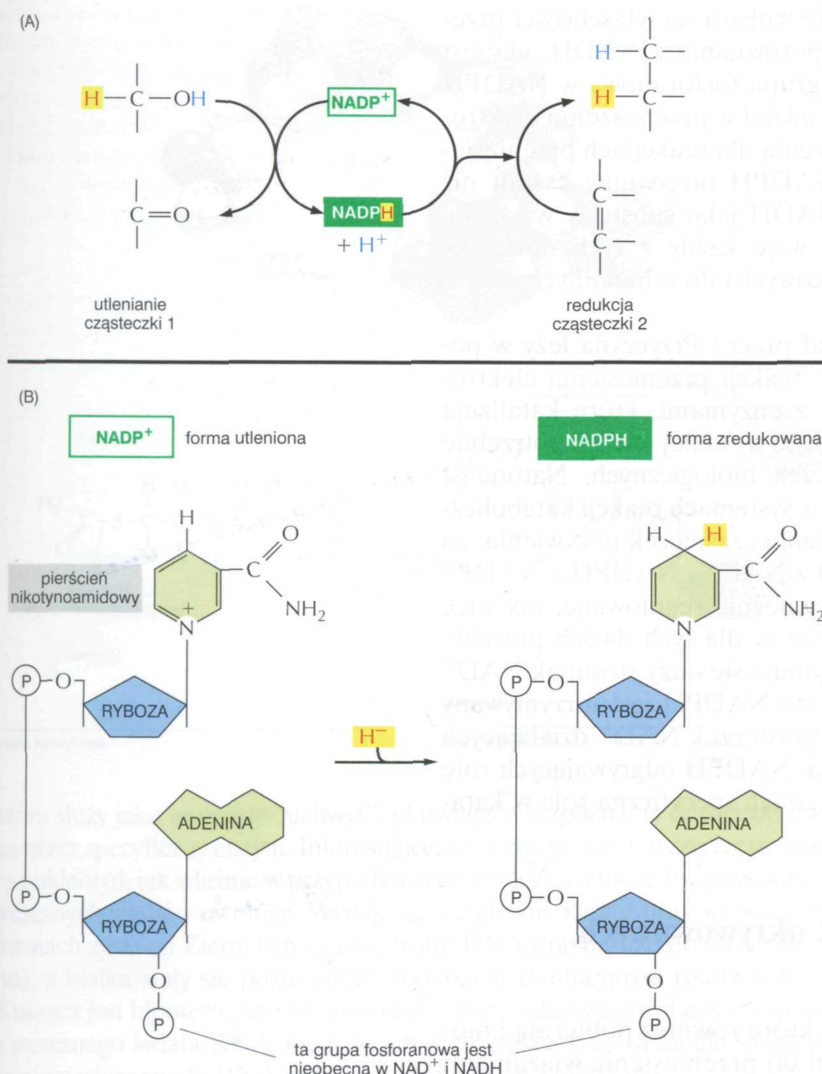


Rys. 3-27. Przykład energetycznie niekorzystnej reakcji biosyntezy napędzanej przez hydrolizę ATP. (A) Schematyczny rysunek tworzenia A—B w reakcji kondensacji opisanej w tekście. (B) Biosynteza glutaminy. Kwas glutaminowy jest najpierw przekształcany w „wysokoenergetyczny” ufosforylowany intermediat (odpowiadający elementowi B—O—PO_3 opisanemu w tekście), który następnie reaguje z jonem amonowym (odpowiadającym A—H) tworząc glutaminę. W tym przykładzie oba etapy zachodzą na powierzchni tego samego enzymu, *syntetazy glutaminowej*. Dla przejrzystości aminokwasy pokazano w postaci nienaładowanej

Właśnie tego typu reakcją biosyntezy posługuje się komórka, by otrzymać aminokwas glutaminę, jak przedstawiono to na rysunku 3-27B. Wkrótce zobaczymy, że bardzo podobne (choć bardziej skomplikowane) mechanizmy są także wykorzystywane do tworzenia prawie wszystkich dużych cząsteczek w komórce.

NADH i NADPH są ważnymi nośnikami elektronów

Inne ważne cząsteczki aktywowanych nośników biorą udział w reakcjach oksydoredukcyjnych (utleniania i redukcji) i zwykle uczestniczą w sprzężonych reakcjach w komórce. Te aktywowane nośniki są wyspecjalizowane w przenoszeniu elektronów o wysokiej energii oraz atomów wodoru. Najważniejszymi z tych nośników elektronów są: **NAD^+** (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) i podobna do niego cząsteczka **$NADP^+$** (fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego). Później przeanalizujemy pewne reakcje, w których biorą udział NAD^+ i $NADP^+$, niosąc „pakiet energii” odpowiadający dwu elektronom o wysokiej energii plus proton (H^+), i stając się odpowiednio **NADH** (*zredukowany* dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) oraz **NADPH** (*zredukowany* fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego). Cząsteczki te mogą być więc traktowane także jako nośniki jonów wodorkowych (H^+ plus dwa elektrony lub H^-).

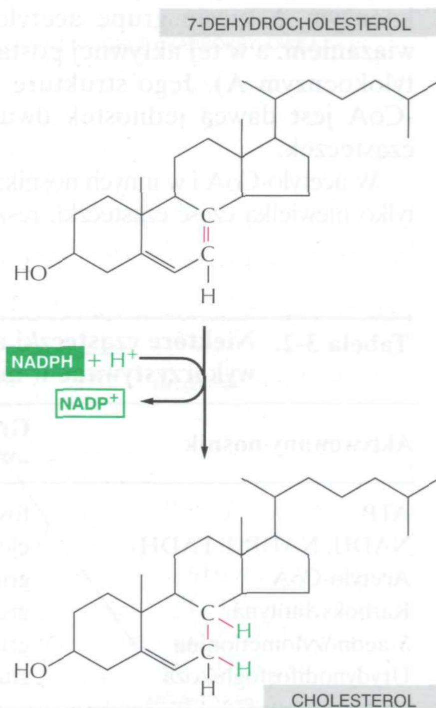


Rys. 3-28. NADPH ważny nośnik elektronów. (A) NADPH jest tworzony w reakcjach ogólnego typu pokazanych po lewej stronie rysunku, w których atomy wodoru są usuwane z substratu. Utleniona postać cząsteczki nośnika, $NADP^+$, otrzymuje jeden atom wodoru plus elektron (jon wodorkowy), a proton (H^+) pochodzący z innego atomu H jest uwalniany do roztworu. Ponieważ NADPH utrzymuje swój jon wodorkowy wiązaniem „wysokoenergetycznym", dodany jon wodorkowy może być łatwo przeniesiony na inną cząsteczkę, jak pokazano po prawej stronie rysunku.

(B) Struktura $NADP^+$ i NADPH. Część cząsteczki $NADP^+$, znana jako pierścień nikotynoamidowy, przyjmuje dwa elektrony razem z protonem (równoważnik jonu wodorkowego, H^-) tworząc NADPH. Cząsteczki NAD^+ i NADH mają identyczną strukturę z, odpowiednio, $NADP^+$ i NADPH, z tym wyjątkiem, że brak w nich grupy fosforanowej, wskazanej na rysunku

Podobnie jak ATP, NADPH jest aktywnym nośnikiem energii uczestniczącym w wielu ważnych reakcjach biosyntezy, które w przeciwnym wypadku byłyby energetycznie niekorzystne. NADPH powstaje zgodnie z ogólnym schematem przedstawionym na rys. 3-28. Podczas specjalnego szlaku reakcji katabolicznych dostarczającego energii, atom wodoru plus dwa elektrony zostają usunięte z cząsteczki substratu i dodane do pierścienia nikotynoamidowego $NADP^+$ tworząc NADPH. Jest to typowa reakcja oksydoredukcyjna; substrat jest utleniany, a $NADP^+$ ulega redukcji.

Jon wodorkowy przenoszony przez NADPH jest łatwo oddawany w dalszych reakcjach oksydoredukcyjnych, ponieważ bez niego pierścień nikotynoamidowy może osiągnąć bardziej stabilny rozkład elektronów. W tej reakcji, regenerującej $NADP^+$, następuje utlenienie NADPH i redukcja substratu. NADPH jest efektywnym donorem jonu wodorkowego dla innych cząsteczek z tego samego powodu, dla którego ATP łatwo przekazuje fosforan: w obu przypadkach przeniesieniu towarzyszy duża ujemna zmiana energii swobodnej. Na rysunku 3-29 pokazano przykład wykorzystania NADPH w reakcji biosyntezy.



Rys. 3-29. Końcowy etap w jednym z biosyntetycznych szlaków prowadzących do cholesterolu. Jak w wielu reakcjach biosyntezy, redukcja wiązania C=C zachodzi w wyniku przeniesienia jonu wodorkowego z cząsteczki nośnika NADPH z dodatkiem protonu (H^+) z roztworu

Różnica jednej grupy fosforanowej nie wpływa na właściwości przenoszenia elektronów przez NADPH w porównaniu z NADH, ale jest krytyczna dla rozróżniania. Dodatkowa grupa fosforanowa w NADPH znajduje się z dala od regionu biorącego udział w przenoszeniu elektronów (patrz rysunek 3-28B) i nie ma znaczenia dla reakcji ich przeniesienia. Jednakże nadaje ona cząsteczce NADPH nieco inny kształt niż NADH, w związku z czym NADPH i NADH jako substraty wiążą się z odmiennymi grupami enzymów. Tak więc każdy z tych nośników dostarcza elektronów (lub jonów wodorkowych) do odmiennych miejsc przeznaczenia.

Dlaczego powinien istnieć taki podział pracy? Przyczyna leży w potrzebie niezależnej regulacji dwóch grup reakcji przeniesienia elektronów. NADPH działa przede wszystkim z enzymami, które katalizują reakcje anaboliczne, dostarczając elektrony o wysokiej energii potrzebne do syntezy bogatych w energię cząsteczek biologicznych. Natomiast NADH ma specjalną rolę jako pośrednik w systemach reakcji katabolicznych wytwarzających ATP podczas utleniania cząsteczek pożywienia, co omówiono w rozdz. 4. Tworzenie NADH z NAD^+ i NADPH z $NADP^+$ zachodzi odmiennymi szlakami i jest niezależnie regulowane, tak więc komórka może regulować dopływ elektronów dla tych dwóch przeciwstawnych zadań. Wewnątrz komórki utrzymuje się duży stosunek NAD^+ do NADH, natomiast stosunek $NADP^+$ do NADPH jest utrzymywany na niskim poziomie. Dostarcza to wielu cząsteczek NAD^+ działających jako czynnik utleniający i wielu cząsteczek NADPH odgrywających rolę czynnika redukującego — jak wymaga tego ich specyficzna rola w katabolizmie i anabolizmie.

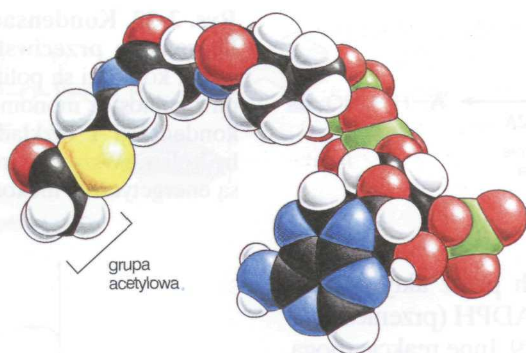
Istnieje wiele innych cząsteczek aktywowanych nośników w komórce

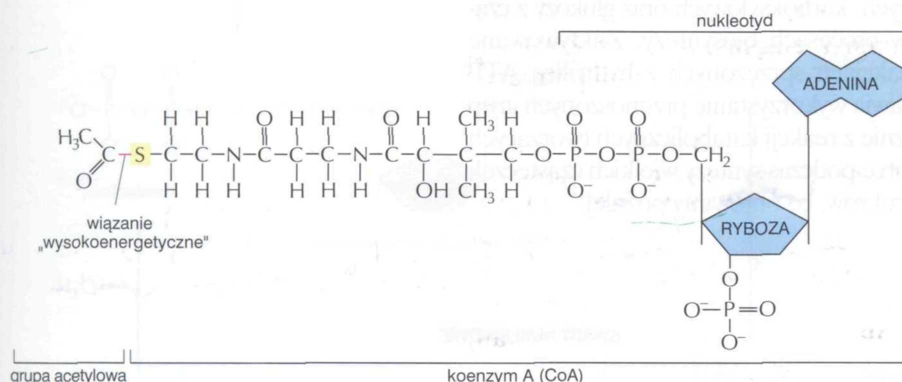
Istnieją także inne aktywowane nośniki, które również pobierają i niosą grupy chemiczne przyłączone łatwymi do przeniesienia wiązaniami o wysokiej energii („wysokoenergetycznymi"), (tab. 3–2). Na przykład koenzym A niesie grupę acetylową połączoną łatwo przenoszonym wiązaniem, a w tej aktywnej postaci jest znany jako **acetylo-CoA** (acetylokoenzym A). Jego strukturę przedstawiono na rys. 3-30; acetylo-CoA jest dawcą jednostek dwuwęglowych w biosyntezie większych cząsteczek.

W acetylo-CoA i w innych nośnikach (tab. 3-2) przenoszona grupa stanowi tylko niewielką część cząsteczki; reszta składa się z dużej części organicznej,

Tabela 3-2. Niektóre cząsteczki aktywowanych nośników powszechnie wykorzystywane w metabolizmie

Aktywowany nośnik	Grupa przyłączana wiązaniem „wysokoenergetycznym"
ATP	fosforan
NADH, NADPH, $FADH_2$	elektrony i atomy wodoru
Acetylo-CoA	grupa acetylowa
Karboksybiotyna	grupa karboksylowa
S-aednozylometionina	grupa metylowa
Urydynodifosfoglukoza	glukoza

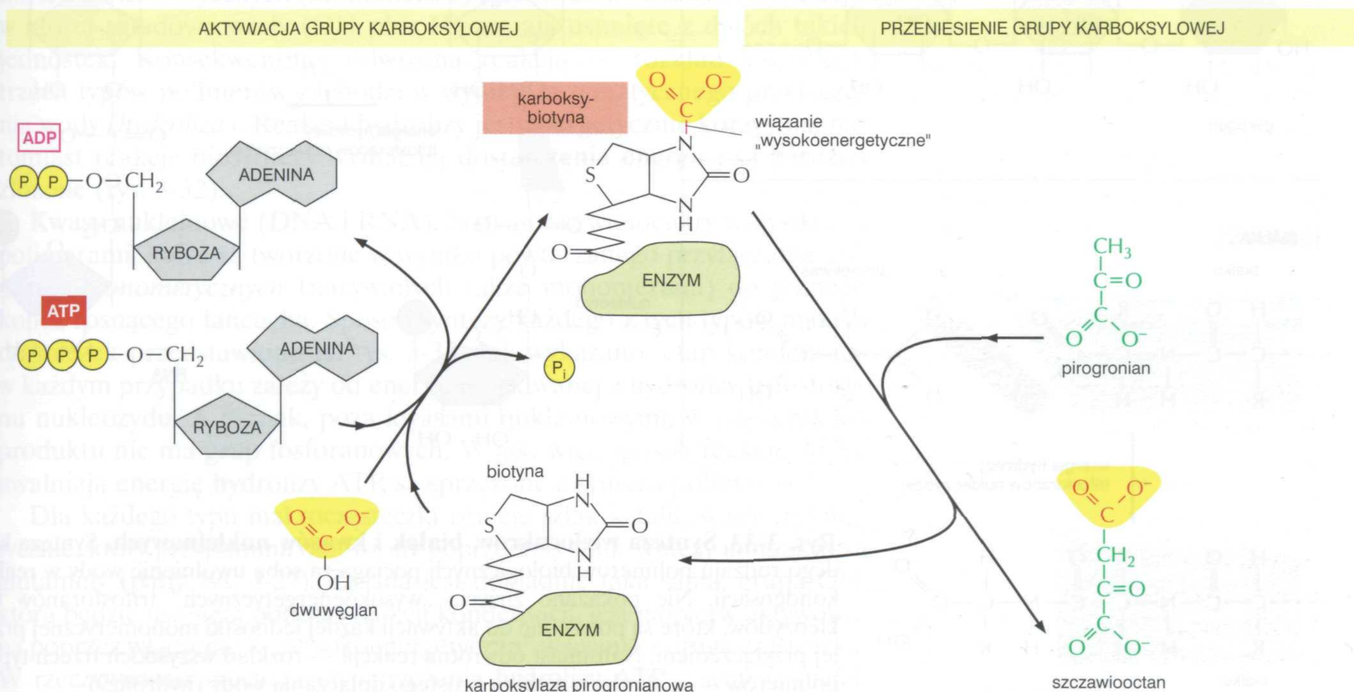


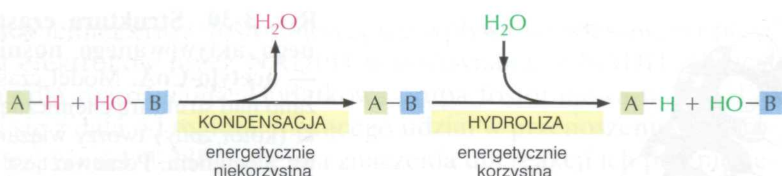


Rys. 3-30. Struktura cząsteczki ważnego aktywowanego nośnika energii — acetylo-CoA. Model czaszowy pokazano nad strukturą chemiczną. Atom siarki (kolor *żółty*) tworzy wiązanie tioestrowe z octanem. Ponieważ jest to wiązanie „wysokoenergetyczne", uwalniające dużą ilość energii swobodnej w czasie hydrolizy, cząsteczka octanu może łatwo ulegać przeniesieniu na inne cząsteczki

która służy jako wygodny „uchwyt", ułatwiający rozpoznanie cząsteczki nośnika przez specyficzny enzym. Interesujące, że „uchwyt" ten bardzo często zawiera nukleotyd, jak właśnie w przypadku acetylo-CoA, co może być pozostałością wczesnych stadiów ewolucji. Wydaje się, że główne katalizatory we wczesnych formach życia na Ziemi były cząsteczkami RNA (lub bardzo do nich zbliżonymi), a białka stały się późniejszym dodatkiem ewolucyjnym (patrz rozdz. 7). Kusząca jest hipoteza, że wiele nośników, które odkrywamy obecnie, pochodzi z wczesnego świata RNA, kiedy to ich część nukleotydowa mogła służyć jako miejsce wiązania do RNA pełniącego funkcje enzymatyczne.

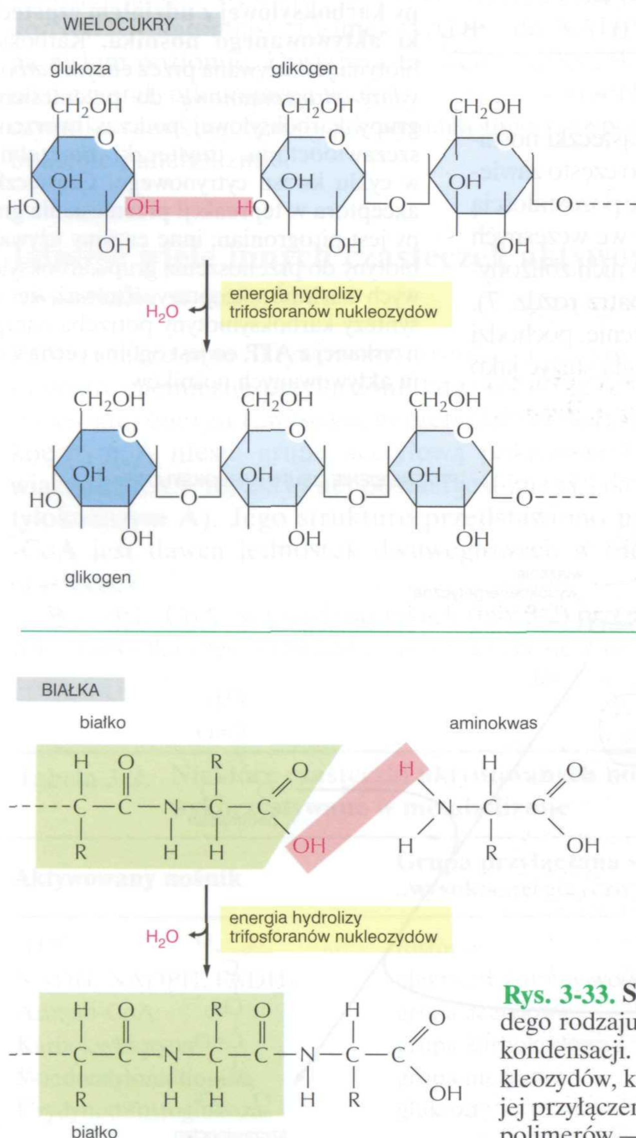
Rys. 3-31. Reakcja przeniesienia grupy karboksylowej z udziałem cząsteczki aktywowanego nośnika. Karboksybiotyna jest używana przez enzym *karboksylazę pirogronianową* do przeniesienia grupy karboksylowej podczas tworzenia szczawiooctanu, cząsteczki potrzebnej w cyklu kwasu cytrynowego. Cząsteczką akceptora w tej reakcji przeniesienia grupy jest pirogronian; inne enzymy używają biotyny do przenoszenia grup karboksylowych na inne akceptory. Zauważ, że do syntezy karboksybiotyny potrzeba energii uzyskanej z ATP, co jest ogólną cechą wielu aktywowanych nośników

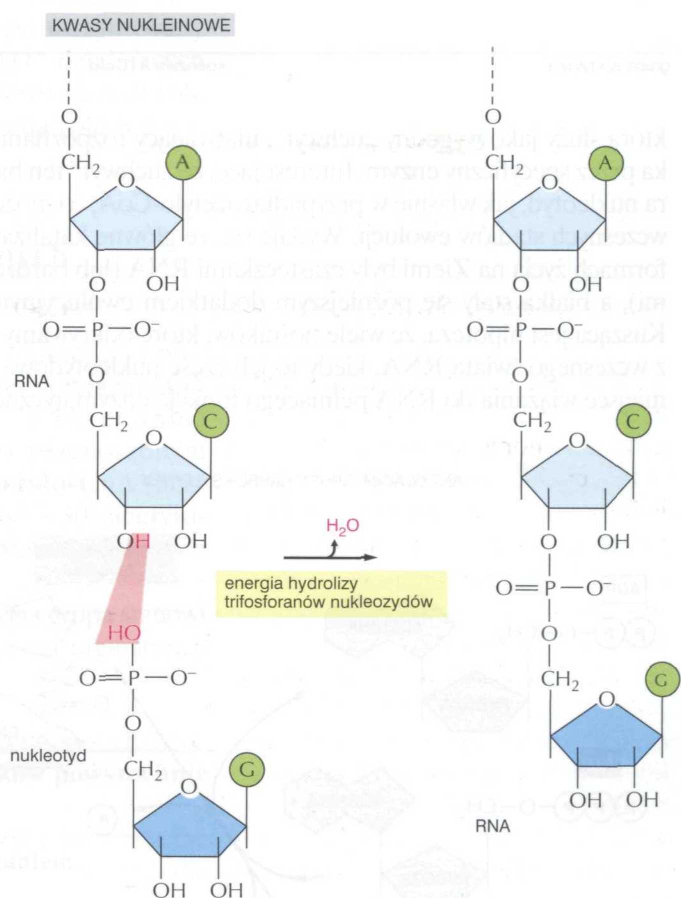




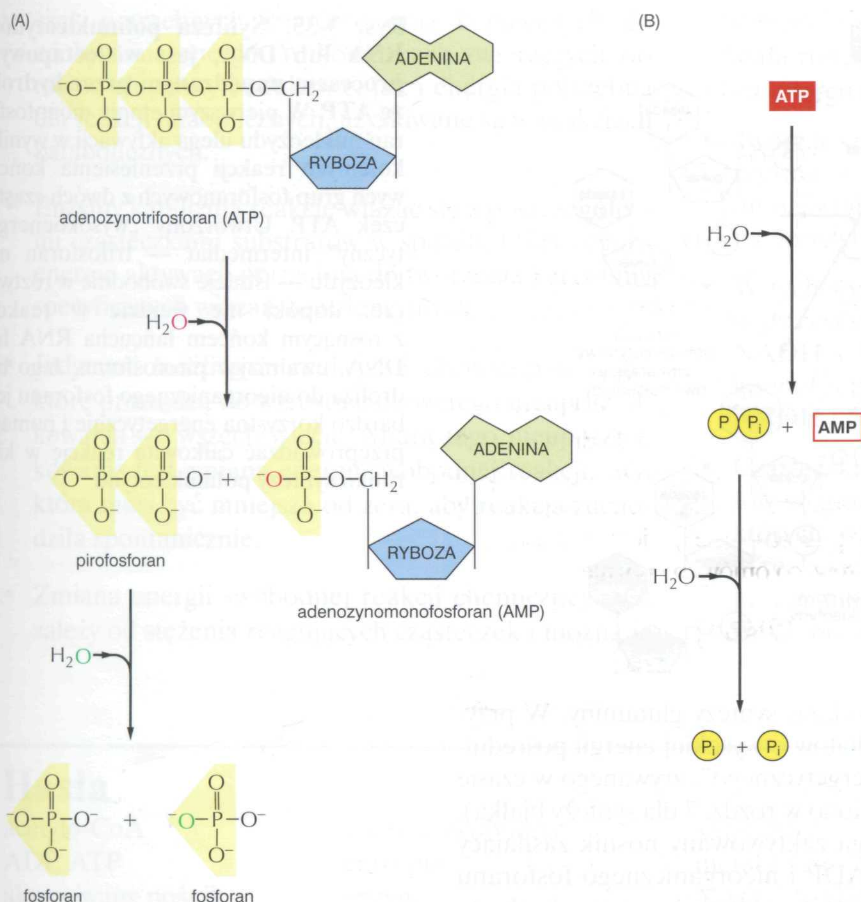
Rys. 3-32. Kondensacja i hydroliza jako reakcje przeciwstawne. Makrocząsteczki komórki są polimerami utworzonymi z jednostek monomerycznych w reakcji kondensacji i rozkładanymi w procesie hydrolizy. Wszystkie reakcje kondensacji są energetycznie niekorzystne

Przykłady typów reakcji przeniesienia katalizowanych przez aktywowaną cząsteczkę nośnika — ATP (przeniesienie fosforanu) i NADPH (przeniesienie elektronów i wodoru) — przedstawiono na rys. 3-26 i 3-29. Inne reakcje mogą obejmować przeniesienie grup metylowych, karboksylowych oraz glukozy z cząsteczki zaktywowanego nośnika, ważne w procesach biosyntezy. Zaktywowane formy nośników zwykle powstają w reakcjach sprzężonych z hydrolizą ATP (rys. 3-31). Tak więc energia, która umożliwia wykorzystanie przenoszonych grup w reakcjach biosyntezy pochodzi ostatecznie z reakcji katabolicznych tworzących ATP. Podobne procesy zachodzą w komórce podczas syntezy wielkich cząsteczek — kwasów nukleinowych, białek i wielocukrów, co omówimy później.





Rys. 3-33. Synteza wielocukrów, białek i kwasów nukleinowych. Synteza każdego rodzaju polimerów biologicznych pociąga za sobą uwolnienie wody w reakcji kondensacji. Nie pokazano zużycia „wysokoenergetycznych" trifosforanów nukleozydów, które są potrzebne do aktywacji każdej jednostki monomerycznej przed jej przyłączeniem. Natomiast odwrotna reakcja — rozkład wszystkich trzech typów polimerów — zachodzi w wyniku prostego dołączania wody (hydrolizy)



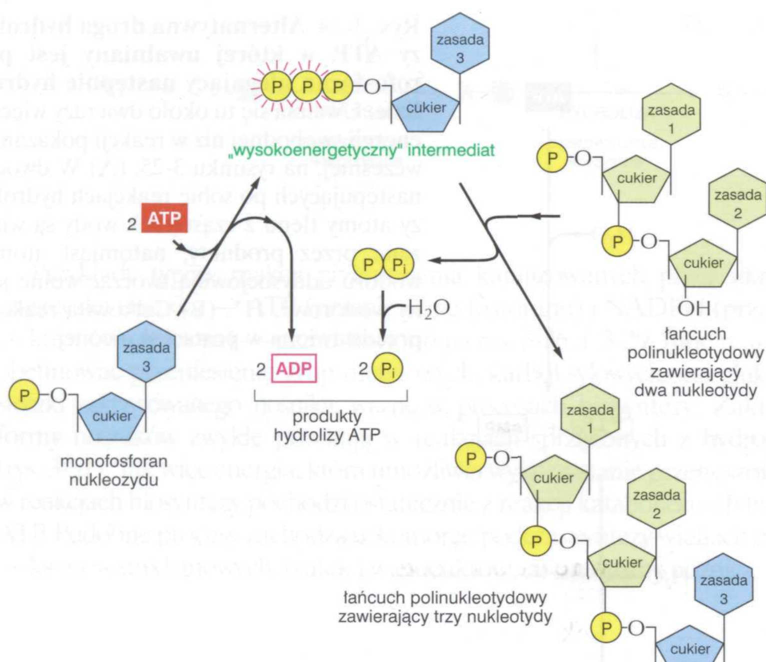
Rys. 3-34. Alternatywna droga hydrolizy ATP, w której uwalniany jest pirofosforan ulegający następnie hydrolizie. Uwalnia się tu około dwa razy więcej energii swobodnej niż w reakcji pokazanej wcześniej, na rysunku 3-25. (A) W dwóch następujących po sobie reakcjach hydrolizy atomy tlenu z cząsteczek wody są wiązane przez produkty, natomiast atomy wodoru oddysocjowują tworząc wolne jony wodorowe, H^+. (B) Całkowita reakcja przedstawiona w postaci skróconej

Synteza biopolimerów wymaga dostarczenia energii

Makrocząsteczki w komórce stanowią zdecydowaną większość jej suchej masy, tj. masy bez wody. Makrocząsteczki te są zbudowane z małych jednostek monomerycznych (monomerów) łączonych w reakcji *kondensacji*, w której składowe wody (OH plus H) zostają usunięte z dwóch takich jednostek. Konsekwentnie, odwrotna reakcja — rozkład wszystkich trzech typów polimerów zachodzi w wyniku enzymatycznego przyłączenia wody (*hydroliza*). Reakcja hydrolizy jest energetycznie korzystna, natomiast reakcje biosyntezy wymagają dostarczenia energii i są bardziej złożone (rys. 3-32).

Kwasy nukleinowe (DNA i RNA), białka oraz wielocukry wszystkie są polimerami, które są tworzone w wyniku powtarzanego przyłączania *jednostek monomerycznych* (nazywanych także monomerami) do jednego końca rosnącego łańcucha. Sposób syntezy każdego z tych typów makrocząsteczek przedstawiono na rys. 3-33. Jak wykazano, etap kondensacji w każdym przypadku zależy od energii uzyskiwanej z hydrolizy trifosforanu nukleozydu. A jednak, poza kwasami nukleinowymi, w cząsteczkach produktu nie ma grup fosforanowych. W jaki więc sposób reakcje, które uwalniają energię hydrolizy ATP, są sprzężone z syntezą polimerów?

Dla każdego typu makrocząsteczki istnieje szlak katalizowany enzymatycznie, który przypomina omówiony poprzednio szlak syntezy aminokwasu glutaminy (patrz rys. 3-27). Zasada jest dokładnie taka sama; grupa OH, która będzie usunięta podczas reakcji kondensacji, jest najpierw aktywowana poprzez włączenie w „wysokoenergetyczne" wiązanie z drugą cząsteczką. W rzeczywistości mechanizmy sprzężenia hydrolizy ATP z syntezą białek



Rys. 3-35. Synteza polinukleotydów, RNA lub DNA, jest wieloetapowym procesem napędzanym przez hydrolizę ATP. W pierwszym etapie monofosforan nukleozydu ulega aktywacji w wyniku kolejnych reakcji przeniesienia końcowych grup fosforanowych z dwóch cząsteczek ATP. Utworzony „wysokoenergetyczny" intermediat — trifosforan nukleozydu — istnieje swobodnie w roztworze, dopóki nie wejdzie w reakcję z rosnącym końcem łańcucha RNA lub DNA, uwalniając pirofosforan. Jego hydroliza do nieorganicznego fosforanu jest bardzo korzystna energetycznie i pomaga przeprowadzać całkowitą reakcję w kierunku syntezy polinukleotydu

i wielocukrów są bardziej złożone niż podczas syntezy glutaminy. W przypadku makrocząsteczek szereg intermediatów o wysokiej energii pośredniczy w powstawaniu wiązania „wysokoenergetycznego", zrywanego w czasie końcowego etapu kondensacji (co omówiono w rozdz. 7 dla syntezy białka).

Istnieją ograniczenia, którym podlega zaktywowany nośnik zasilający biosyntezę. ΔG dla hydrolizy ATP do ADP i nieorganicznego fosforanu (P_i) zależy od stężenia wszystkich reaktantów, jednakże w warunkach panujących normalnie w komórce przybiera wartość pomiędzy $-46{,}0$ a $-54{,}3$ kJ/mol. W zasadzie ta reakcja hydrolizy może być wykorzystana do przeprowadzenia niekorzystnej termodynamicznie reakcji o ΔG, przyjmijmy, $+42$ kJ/mol, pod warunkiem, że dostępny jest odpowiedni szlak reakcji. Jednakże dla niektórych reakcji biosyntezy nawet $-54{,}0$ kJ/mol może nie być wystarczające. W tych przypadkach przebieg hydrolizy ATP może być zmieniony tak, że początkowo powstaje AMP i pirofosforan (PP_i), a ten ostatni ulega kolejnej hydrolizie (rys. 3-34). Cały proces wyzwala całkowitą energię swobodną o wartości ok. -108 kJ/mol. Ważną reakcję biosyntezy, która przebiega w ten sposób — syntezę kwasów nukleinowych (polinukleotydów) przedstawiono na rys. 3-35.

Pytanie 3-8. Które z następujących reakcji zajdą tylko wtedy, gdy reakcja będzie sprzężona z drugą, energetycznie korzystną reakcją?

A. glukoza + $O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$
B. $CO_2 + H_2O \rightarrow$ glukoza + O_2
C. trifosforany nukleozydów $\rightarrow$ DNA
D. zasady nukleotydowe $\rightarrow$ trifosforany nukleozydów
E. ADP + Ⓟ $\rightarrow$ ATP

Streszczenie

- Żywe organizmy są zdolne do istnienia dzięki ciągłemu dopływowi energii. Część tej energii jest wykorzystywana do pełnienia zasadniczych funkcji — takich jak wegetacja, wzrost i rozmnażanie, a pozostała część rozprasza się w postaci ciepła.
- Podstawowym źródłem energii dla większości żywych organizmów jest Słońce. Rośliny i bakterie fotosyntetyzujące wykorzystują energię słoneczną do produkcji cząsteczek organicznych z dwutlenku węgla. Zwierzęta uzyskują pożywienie zjadając rośliny lub inne zwierzęta, które żywią się roślinami.
- Każda z wielu setek reakcji chemicznych zachodzących w komórce jest specyficznie katalizowana przez enzymy. Ogromna ilość różnych enzymów działa w sekwencjach, tworząc łańcuchy reakcji nazywane szlakami metabolicznymi, z których każdy pełni określoną funkcję w komórce.
- Reakcje kataboliczne rozkładają cząsteczki pożywienia szlakami utleniania i uwalniają energię. Reakcje anaboliczne budują wiele skomplikowanych cząste-

czek potrzebnych komórce oraz koniecznych do zdobywania energii. W komórkach zwierzęcych zarówno elementy budulcowe, jak i energia potrzebna dla reakcji anabolicznych, uzyskiwane są w reakcjach katabolicznych.

- Enzymy katalizują reakcje wiążąc się z poszczególnymi cząsteczkami substratów w sposób, który obniża energię aktywacji potrzebną do tworzenia i zrywania specyficznych wiązań kowalencyjnych.
- Jedynymi możliwymi reakcjami chemicznymi są te, które prowadzą do wzrostu całkowitego nieuporządkowania we wszechświecie. Miarą tego nieuporządkowania jest zmiana energii swobodnej reakcji, ΔG, która musi być mniejsza od zera, aby reakcja zachodziła spontanicznie.
- Zmiana energii swobodnej reakcji chemicznej, ΔG, zależy od stężenia reagujących cząsteczek i można ją obliczyć na podstawie tych stężeń, jeżeli znana jest stała równowagi (K) reakcji (lub standardowa zmiana energii swobodnej $\Delta G°$ reaktantów).
- Tworząc szlaki sprzęgające reakcje energetycznie korzystne z energetycznie niekorzystnymi, enzymy umożliwiają reakcje, które bez takiego sprzężenia nie mogłyby zachodzić.
- W tych sprzężonych reakcjach główną rolę odgrywa mały zestaw zaktywowanych nośników, głównie ATP, NADH i NADPH. Pierwszy z nich niesie „wysokoenergetyczne" grupy fosforanowe, natomiast NADH i NADPH — elektrony o wysokiej energii.
- Cząsteczki zawarte w pokarmie są źródłem szkieletów węglowych do tworzenia większych cząsteczek, których wiązania kowalencyjne z reguły powstają w reakcjach sprzężonych z energetycznie korzystnymi zmianami wiązań w aktywowanej cząsteczce nośnika, prowadzącymi do powstania ATP i NADPH.

Hasła

acetylo-CoA	energia swobodna	katalizator	reakcje sprzężone
ADP, ATP	entropia	metabolizm	redukcja
aktywowany nośnik	enzym	NAD^+, NADH	stan równowagi
dyfuzja	fotosynteza	$NADP^+$, NADPH	substrat
energia aktywacji	ΔG, $\Delta G°$	oddychanie	utlenianie

Pytania

Pytanie 3-9. Które z następujących twierdzeń są prawdziwe? Uzasadnij odpowiedź.

A. Niektóre reakcje enzymatyczne ulegają kompletnemu zatrzymaniu, jeżeli katalizujący je enzym jest nieobecny.

B. Elektrony na wyższym poziomie energetycznym (takie jak znajdowane w czasteczkach aktywnych nośników NADH i NADPH) poruszają się szybciej wokół jądra atomu.

C. Hydroliza ATP do AMP może dostarczyć prawie dwukrotnie więcej energii niż hydroliza ATP do ADP.

D. Częściowo utleniony atom węgla ma mniejszą średnicę niż atom bardziej zredukowany.

E. Niektóre cząsteczki aktywowanych nośników mogą przenosić energię i grupy chemiczne.

F. Reguła, że utlenianie uwalnia energię, podczas gdy redukcja wymaga dostarczenia energii, odnosi się do wszystkich reakcji chemicznych, nie tylko do tych które zachodzą w żywych komórkach.

G. Zwierzęta zmiennocieplne mają wadę energetyczną, ponieważ oddają mniej ciepła do środowiska niż zwierzęta stałocieplne. Zmniejsza to ich zdolność do syntezy uporządkowanych makrocząsteczek.

H. Powiązanie reakcji X → Y z drugą, energetycznie korzystną reakcją Y → Z przesunie stałą równowagi pierwszej reakcji.

Pytanie 3-10. Rozpatrz przekształcenie A → B na rys. 3-20. Cząsteczka B różni się od A obecnością wiązania niekowalencyjnego. Załóżmy, że jedyną różnicą między A i B jest obecność w B trzech wiązań wodorowych, których brak w A. Jaka jest proporcja A do B, kiedy reakcja osiągnie stan równowagi? Zaokrąglij wartości używając tab. 3-1 (s. 92), przyjmując 4,2 kJ/mol jako energię każdego wiązania wodorowego. Załóżmy, że B otrzyma trzy dodatkowe wiązania wodorowe, tj. w sumie będzie miało sześć odróżniających go od A. Jak zmieniłoby to proporcję A do B?

Pytanie 3-11. Omów twierdzenie: „To, czy ΔG reakcji jest większe, mniejsze czy takie samo jak $\Delta G°$, zależy od stężenia składników biorących udział w reakcji".

Pytanie 3-12.

A. Ile cząsteczek ATP może maksymalnie powstać dzięki jednej cząsteczce glukozy, jeżeli całkowite utlenienie 1 mola glukozy do CO_2 i H_2O dostarcza 2870 kJ, a użyteczna energia chemiczna dostępna w „wysokoenergetycznym" wiązaniu fosforanowym wynosi 50,2 kJ?

B. Oddychanie dostarcza 30 moli ATP z 1 mola glukozy. Porównaj tę liczbę z odpowiedzią na poprzednie pytanie. Jaka jest całkowita wydajność wytwarzania ATP z glukozy?

C. Jeżeli komórki Twojego ciała utleniają 1 mol glukozy, to o ile wzrosłaby temperatura ciała (przyjmijmy, że składa się ono z 75 kg wody), gdyby ciepło nie ulegało rozproszeniu w otoczeniu? [Przypominamy, że do ogrzania 1 kg H_2O o 10°C potrzeba wg definicji 1 kcal (co odpowiada 4,184 kJ używanych w polskim tłumaczeniu książki jako jednostek energii — *przyp. tłum.*)].

D. Co by się stało, gdyby komórki Twojego ciała mogły przekształcać energię z cząsteczek pożywienia z wydajnością tylko 20%? Czy Twoje ciało: a) pracowałoby dobrze, b) uległoby przegrzaniu lub c) zamarzłoby?

E. Odpoczywający człowiek hydrolizuje około 40 kg ATP w ciągu doby. Ile glukozy trzeba utlenić aby uzyskać taką ilość energii? (Wskazówka: przyjrzyj się strukturze ATP na rysunku 2-21 i oblicz jego masę cząsteczkową; masy atomowe H, C, N, O i P wynoszą odpowiednio 1, 12, 14, 16 i 31).

Pytanie 3-13. Wybitny naukowiec utrzymywał, że posiada izolowane komórki mutanta mogące przekształcić 1 cząsteczkę glukozy w 57 cząsteczek ATP. Czy to odkrycie powinno stać się sławne, czy też podejrzewasz, że coś może być z nim nie tak? Wyjaśnij odpowiedź.

Pytanie 3-14. Reakcja w jednoetapowym szlaku biosyntezy, która przekształca metabolit w określoną niebezpieczną truciznę, jest wysoce niekorzystna energetycznie (metabolit ⇄ trucizna). Reakcja jest normalnie napędzana hydrolizą ATP. Załóżmy, że mutacja w enzymie katalizującym reakcję uniemożliwia mu używanie ATP, ale wciąż pozwala na katalizowanie reakcji.

A. Czy przypuszczasz, że zjedzenie takiego mutanta może być bezpieczne dla Ciebie? Oprzyj swoją odpowiedź na określeniu, o ile mniej trucizny wyprodukowałby organizm mutanta, zakładając, że reakcja jest w równowadze, a większość energii zmagazynowana w ATP jest używana do przeprowadzenia niekorzystnej reakcji.

B. Czy Twoja odpowiedź byłaby różna w przypadku innego zmutowanego enzymu, który wprawdzie sprzęga reakcję z hydrolizą ATP, ale działa 100 razy wolniej?

Pytanie 3-15. W prostej reakcji A ⇄ A* cząsteczka ulega przekształceniu między dwiema formami różniącymi się standardową zmianą energii swobodnej o 18,0 kJ/mol, gdzie A* ma większą G°. (A) Użyj tab. 3-1 (s. 92), aby obliczyć, o ile więcej cząsteczek znajdzie się w formie A* w porównaniu z formą A po osiągnięciu równowagi. (B) Jeżeli jakiś enzym obniża energię aktywacji reakcji o 11,7 kJ/mol, jak zmieniłaby się proporcja A do A*?

Pytanie 3-16. Rozważ efekty działania dwóch enzymów. Enzym A katalizuje reakcję



ATP + GDP ⇄ ADP + GTP

natomiast enzym B katalizuje reakcję



$NADH + NADP^+ \rightleftarrows NAD^+ + NADPH$

Omów, czy enzymy byłyby korzystne czy szkodliwe dla komórek.

4

W jaki sposób komórki uzyskują energię z pokarmu

ROZKŁAD CUKRÓW I TŁUSZCZÓW

- **Cząsteczki pokarmu są rozkładane w trzech etapach, z wytwarzaniem ATP**
- **Glikoliza jest głównym szlakiem wytwarzania ATP**
- **Fermentacja umożliwia wytwarzanie ATP w nieobecności tlenu**
- **Glikoliza jest przykładem, jak enzymy sprzęgają utlenianie z magazynowaniem energii**
- **Cukry i tłuszcze są stopniowo rozkładane w mitochondriach do acetylo-CoA**
- **Cykl kwasu cytrynowego dostarcza NADH przez utlenianie grupy acetylowej do CO_2**
- **Transport elektronów jest w większości komórek głównym zasileniem syntezy ATP**

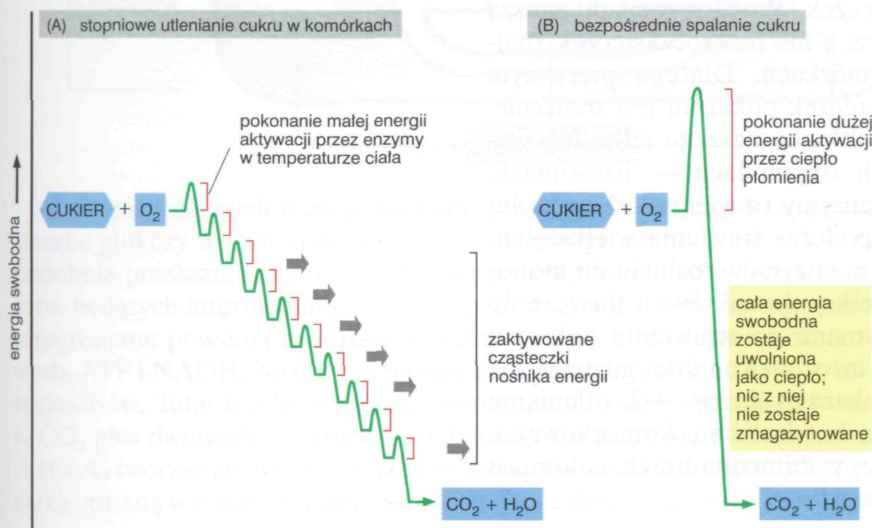
MAGAZYNOWANIE I UŻYTKOWANIE POKARMU

- **Organizmy odkładają cząsteczki pokarmu w specjalnych magazynach**
- **Wiele szlaków biosyntezy zaczyna się od glikolizy lub cyklu kwasu cytrynowego**
- **Metabolizm jest zorganizowany i regulowany**

Komórki wymagają stałego dopływu energii, żeby tworzyć i zachowywać biologiczny porządek utrzymujący je przy życiu. Energia ta pochodzi z energii chemicznych wiązań cząsteczek pokarmowych, służących komórce jako paliwo.

Szczególnie ważnymi cząsteczkami stanowiącymi paliwo są cukry. Rośliny wytwarzają swoje własne cukry w procesie fotosyntezy, natomiast komórki zwierzęce dopiero zjadając inne organizmy pobierają cukry i inne cząsteczki, na przykład skrobię, które przekształcają w cukry. Niemniej proces utleniania cukrów w celu dostarczania energii przebiega bardzo podobnie u zwierząt i u roślin. Podstawowe reguły rządzące tym procesem przedstawiono na rys. 4-1. Energia zmagazynowana w wiązaniach chemicznych cukru jest uwalniana w formie energii swobodnej, gdy cząsteczka cukru ulega rozłożeniu i utlenieniu do CO_2 i H_2O. Energia ta zostaje zachowana w „wysokoenergetycznych" wiązaniach chemicznych zaktywowanych cząsteczek nośników energii, na przykład ATP i NADPH, które z kolei służą jako przenośne źródła grup chemicznych i elektronów potrzebnych do biosyntez (patrz rozdz. 3).

Zaktywowane cząsteczki nośników przenoszą porcje energii lub grupy chemiczne o odpowiedniej wielkości, które będą użyte w poszczególnych, etapach katalizowanych przez enzymy. Jeśliby cząsteczka paliwowa, np. glukoza, była utleniana do CO_2 i H_2O w jednej reakcji, ilość uwolnionej



Rys. 4-1. Porównanie kontrolowanego stopniowego utleniania cukrów w komórce z typowym spalaniem. W komórce enzymy katalizują utlenianie w szeregu reakcji, w których odpowiednie porcje energii swobodnej są przenoszone do cząsteczek nośników energii, najczęściej do ATP i NADH. Każdy etap jest regulowany przez enzym, który obniża próg energii aktywacji, co umożliwia przebieg specyficznej reakcji. Uwalniana całkowita energia swobodna jest dokładnie taka sama w (A) i (B)

energii wielokrotnie przekroczyłaby „ładowność” jakiejkolwiek cząsteczki nośnikowej. Wobec tego komórka wykorzystuje enzymy do przeprowadzania utleniania w szeregu precyzyjnie kontrolowanych reakcji. Cząsteczka glukozy jest rozkładana krok po kroku, z uwolnieniem małych porcji energii odbieranych przez zaktywowane cząsteczki nośników za pośrednictwem reakcji sprzężonych (patrz rys. 3-23). W ten sposób znaczna część energii uwolnionej podczas utleniania glukozy zostaje uratowana dla komórki w formie nadającej się do przekształcenia w pracę użyteczną.

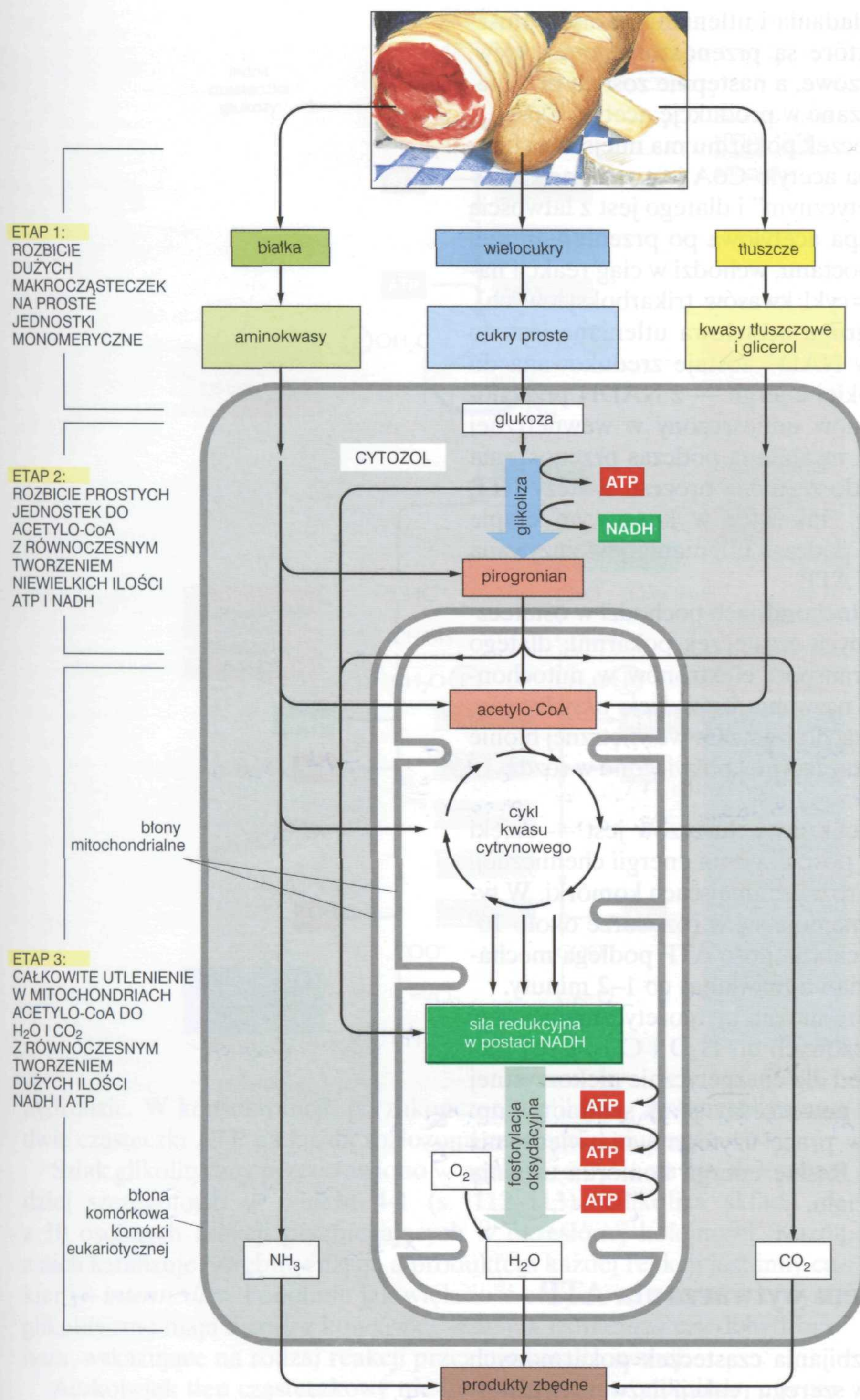
W tym rozdziale naszkicujemy głównie szlaki rozkładu, czyli katabolizmu cukrów i dowiemy się, jak na tych szlakach powstają w komórkach zwierzęcych ATP, NADH i inne aktywowane cząsteczki nośników energii. Skoncentrujemy się na rozkładzie glukozy, ponieważ dominuje on w procesach przekształcania energii w większości komórek zwierzęcych; co więcej bardzo podobne szlaki działają w roślinach, grzybach i wielu bakteriach. Inne cząsteczki, takie jak kwasy tłuszczowe i białka, mogą również służyć jako źródło energii, jeżeli są rozkładane na odpowiednich drogach enzymatycznych.

Rozkład cukrów i tłuszczów

Komórki zwierzęce tworzą ATP dwoma sposobami. Pierwszy polega na tym, że w cytozolu przebiega szereg reakcji enzymatycznych, zakończony częściowym utlenianiem cząsteczek pokarmowych. Drugi polega na wykorzystaniu w mitochondriach energii zaktywowanych cząsteczek nośników do napędzania produkcji ATP. Mechanizm tych dwóch procesów opisano szczegółowo w rozdz. 13. Tutaj skupimy się na sekwencji reakcji, w których cząsteczki pokarmu zostają częściowo utlenione, co prowadzi do produkcji zarówno ATP, jak i zaktywowanych cząsteczek nośników niezbędnych do przekształcania energii w mitochondriach.

Cząsteczki pokarmu są rozkładane w trzech etapach, z wytwarzaniem ATP

Białka, lipidy i wielocukry, znajdujące się w większości zjadanych przez nas pokarmów, muszą zostać rozłożone na mniejsze cząsteczki zanim nasze komórki będą mogły je wykorzystać albo jako źródło energii, albo jako elementy budulcowe innych cząsteczek. Procesy rozpadu muszą dotyczyć pokarmu pobranego z zewnątrz, a nie makrocząsteczek znajdujących się w naszych własnych komórkach. Dlatego pierwszym etapem enzymatycznego rozbijania cząsteczek pokarmu jest *trawienie*, które zachodzi na zewnątrz komórek nabłonka naszego jelita lub wewnątrz komórki, w wyspecjalizowanych organellach — lizosomach. (Błony otaczające lizosomy izolują ich enzymy trawienne od cytozolu; patrz rozdz. 14). W każdym wypadku podczas trawienia wielkie cząsteczki polimerów ulegają pod działaniem enzymów rozbiciu do monomerów: białka do aminokwasów, wielocukry do cukrów, a tłuszcze do kwasów tłuszczowych i glicerolu. Otrzymane po strawieniu pokarmu małe cząsteczki organiczne wchodzą do cytozolu komórki, gdzie zaczyna się ich stopniowe utlenianie. Jak pokazano na rys. 4-2, utlenianie przebiega w dwóch dalszych etapach katabolizmu komórkowego: etap 2 rozpoczyna się w cytozolu, a kończy w mitochondriach, natomiast etap 3 przebiega w całości w mitochondriach.



Rys. 4-2. Schemat trzech etapów metabolizmu komórkowego, które prowadzą w komórce zwierzęcej od pokarmu do produktów zbędnych. Ten szereg reakcji wytwarza ATP, który z kolei zostaje użyty do zasilania reakcji biosyntez i pozostałych procesów wymagających energii w komórce. Etap 1 odbywa się na zewnątrz komórki. Etap 2 zachodzi głównie w cytozolu, z wyjątkiem końcowej reakcji przekształcania pirogronianu w acetylo CoA, która przebiega w mitochondriach. Etap 3 zachodzi w mitochondriach

W etapie 2 łańcuch reakcji nazwany *glikolizą* przekształca każdą cząsteczkę glukozy w dwie mniejsze cząsteczki pirogronianu. Inne cukry są podobnie przekształcane w pirogronian po ich przemianie w jeden z cukrów będących intermediatami szlaku glikolitycznego. Podczas tworzenia pirogronianu powstają dwa rodzaje zaktywowanych cząsteczek nośnikowych, ATP i NADH. Następnie pirogronian przechodzi z cytozolu do mitochodriów. Tutaj każda cząsteczka pirogronianu zostaje przekształcona w CO_2 plus dwuwęglową grupę acetylową, która wiąże się z koenzymem A (CoA) tworząc acetylo-CoA, jeszcze jedną zaktywowaną cząsteczkę nośnika opisaną w rozdz. 3 (patrz rys. 3–30). Duże ilości acetylo-CoA tworzą

się również podczas stopniowego rozkładania i utleniania kwasów tłuszczowych pochodzących z tłuszczów, które są przenoszone przez krew, wchodzą do komórki jako kwasy tłuszczowe, a następnie zostają przeniesione do mitochondriów, gdzie są włączane w produkcję acetylo-CoA.

Etap 3 utleniania rozłożonych cząsteczek pokarmu ma miejsce wyłącznie w mitochondriach. Acetylowa grupa acetylo-CoA jest związana z koenzymem A wiązaniem „wysokoenergetycznym" i dlatego jest z łatwością przekazywana na inne cząsteczki. Grupa acetylowa po przeniesieniu jej do czterowęglowej cząsteczki, szczawiooctanu, wchodzi w ciąg reakcji nazwanych *cyklem kwasu cytrynowego* (=cykl kwasów trikarboksylowych). Mówiąc skrótowo, w tych reakcjach grupa acetylowa utleniana jest do CO_2, a duża ilość nośnika elektronów NAD^+ zostaje zredukowana do NADH. W końcu elektrony — o wysokiej energii — z NADH przechodzą przez łańcuch transportu elektronów umieszczony w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, gdzie energia uwalniana podczas przenoszenia tych elektronów zostaje wykorzystana do zasilania procesu syntezy ATP, zużywającego tlen cząsteczkowy (O_2). Tak więc w końcowym etapie przeważająca część energii uwalnianej podczas utleniania jest zużywana do produkcji większości komórkowego ATP.

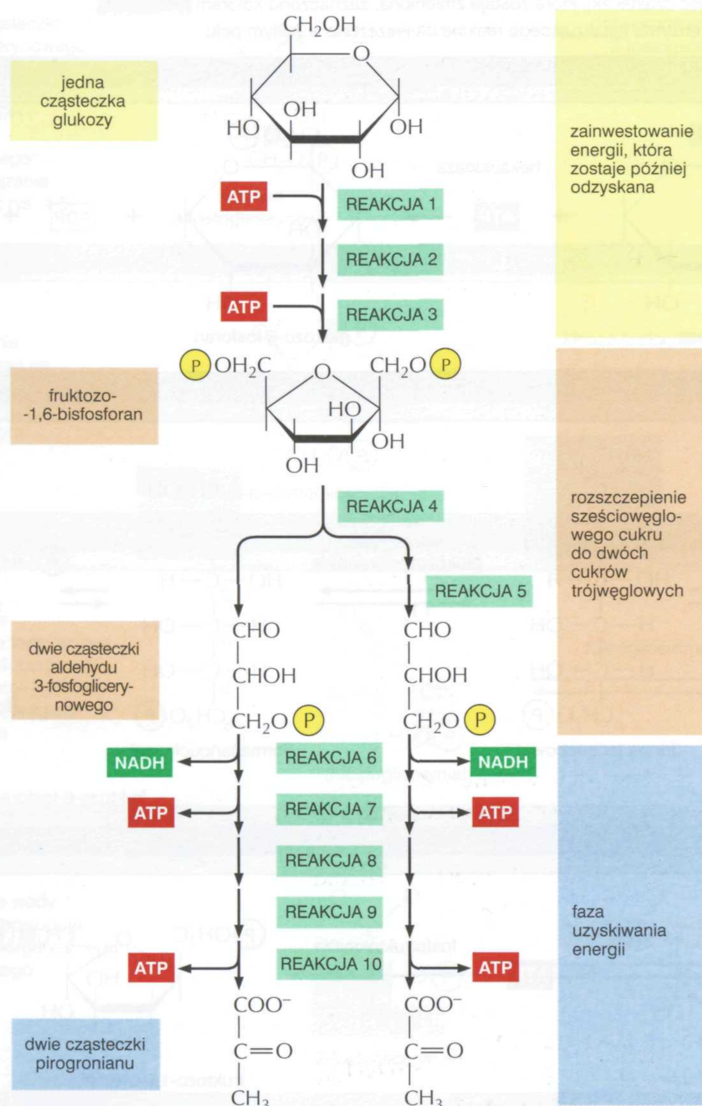
Energia zasilająca syntezę ATP w mitochondriach pochodzi w ostatecznym rozrachunku z utleniania rozłożonych cząsteczek pokarmu; dlatego też fosforylację ADP zasilaną przez transport elektronów w mitochondriach, w wyniku której powstaje ATP, nazwano *fosforylacją oksydacyjną*. Właśnie tym fascynującym zdarzeniom zachodzącym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej podczas fosforylacji oksydacyjnej poświęcono w rozdz. 13 najwięcej uwagi.

Energia uzyskiwana z rozłożonych cukrów i tłuszczów jest — dzięki wytwarzaniu ATP — rozprowadzana w postaci porcji energii chemicznej, w formie dogodnej do wykorzystania w różnych miejscach komórki. W typowej komórce w każdym momencie znajduje się w roztworze około 10^9 cząsteczek ATP, a w wielu komórkach cała ta ilość ATP podlega mechanizmowi obiegu (to znaczy jest zużywana i odnawiana) co 1–2 minuty.

Ogółem, prawie połowa energii, którą można by teoretycznie uzyskać z utleniania glukozy lub kwasów tłuszczowych do H_2O i CO_2, jest przechwytywana i wykorzystywana jako napęd dla energetycznie niekorzystnej reakcji P_i + ADP → ATP. (Natomiast nowoczesny silnik spalinowy, np. silnik samochodowy, może zamienić w pracę użyteczną nie więcej niż 20% energii zawartej w jego paliwie). Resztę energii komórka uwalnia w postaci ciepła, które ogrzewa nasze ciało.

Glikoliza jest głównym szlakiem wytwarzania ATP

Najważniejszym procesem 2 etapu rozbijania cząsteczek pokarmowych jest stopniowe rozszczepianie glukozy w szeregu reakcji nazwanym **glikolizą** (grec. glykos — „cukier" i lysis — „rozszczepiać"). W glikolizie ATP powstaje bez udziału tlenu cząsteczkowego (O_2 w postaci gazu). Glikoliza zachodzi w cytozolu większości komórek, w tym wielu mikroorganizmów beztlenowych (anaerobowych, tzn. takich, które mogą żyć nie korzystając z tlenu cząsteczkowego). Glikoliza prawdopodobnie powstała wcześnie w historii życia, jeszcze zanim organizmy fotosyntetyzujące wprowadziły tlen do atmosfery. Podczas glikolizy cząsteczka glukozy, zawierająca sześć atomów węgla, zostaje przekształcona do dwóch cząsteczek *pirogronianu*, z których każda zawiera trzy atomy węgla, przy czym powstają cztery cząsteczki ATP. W celu dostarczenia energii, umożliwiającej przebieg wcześniejszych reakcji, dwie cząsteczki ATP ulegają



Rys. 4-3. Schemat glikolizy. Każdą z 10 pokazanych, kolejno następujących reakcji katalizuje inny enzym. Zauważ, że w reakcji 4 sześciowęglowy cukier zostaje rozszczepiony na dwa cukry trójwęglowe, tak iż od tego momentu w każdej reakcji liczba cząsteczek jest podwojona. Jak pokazano, reakcja 6 rozpoczyna fazę uzyskiwania energii; w tej fazie glikolizy zachodzi synteza cząsteczek ATP i NADH (patrz również panel 4-1, s. 112–113).

hydrolizie. W konsekwencji, po zakończeniu glikolizy zysk netto wynosi dwie cząsteczki ATP na każdą rozłożoną cząsteczkę glukozy.

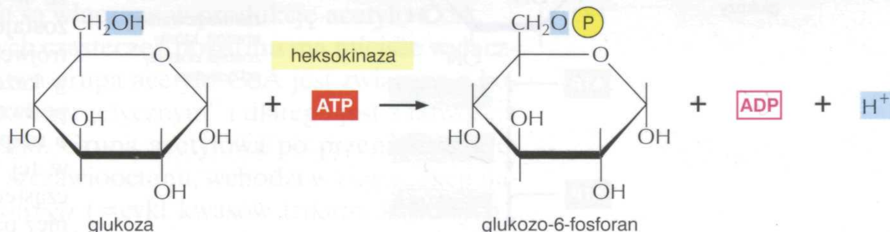
Szlak glikolityczny przedstawiono w ogólnym zarysie na rys. 4-3, a bardziej szczegółowo w panelu 4-1 (s. 112–113). Glikoliza składa się z 10 osobnych reakcji przebiegających w określonej kolejności. Każdą z nich katalizuje odrębny enzym, a produktem każdej reakcji jest inny cukier — *intermediat*. Podobnie jak większość enzymów, wszystkie enzymy glikolityczne mają nazwy z końcówką *-aza*, jak izomer*aza* czy dehydroge*naza*, wskazujące na rodzaj reakcji przez nie katalizowanej.

Aczkolwiek tlen cząsteczkowy nie bierze udziału w glikolizie, utlenianie zachodzi w niej dzięki temu, że elektrony usuwane są przez NAD^+ (tworzy się NADH) z niektórych związków węgla powstałych z cząsteczki glukozy. Stopniowy charakter procesu pozwala uwalniać energię utleniania małymi porcjami, tak że jej większość może być zmagazynowana w zaktywowanych cząsteczkach nośników, a tylko część energii uwalnia się w postaci ciepła (patrz rys. 4–1). Tak więc pewna ilość energii napędza bezpośrednio syntezę cząsteczek ATP z ADP i P_i, a inna część energii pozostaje z elektronami w NADH, nośniku elektronów o wysokiej energii.

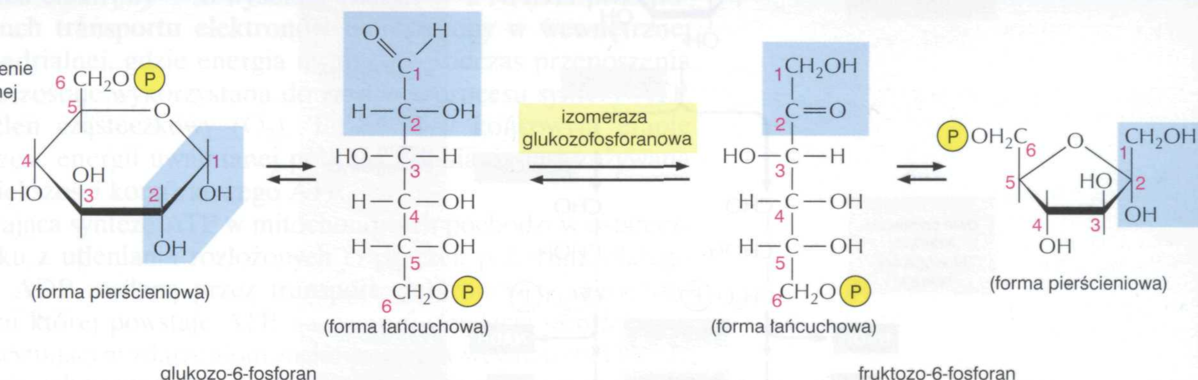
Podczas przebiegu glikolizy na jedną cząsteczkę glukozy powstają dwie cząsteczki NADH. W organizmach tlenowych (aerobowych — tzn. tych, które potrzebują do życia tlenu cząsteczkowego), cząsteczki NADH

W każdej reakcji tę część cząsteczki, która zostaje zmieniona, zaznaczono kolorem niebieskim, a nazwę enzymu katalizującego reakcję umieszczono w żółtym polu

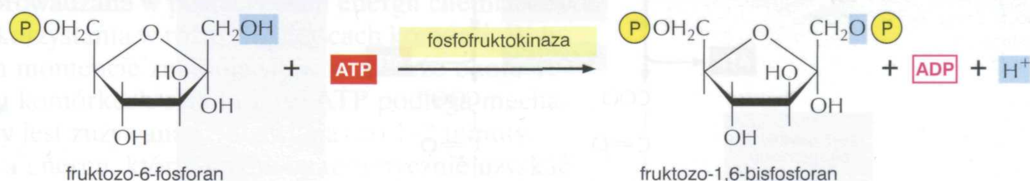
Reakcja 1 Glukoza jest fosforylowana przez ATP i powstaje fosforan cukru. Ujemny ładunek fosforanu zapobiega przejściu cząsteczki przez błonę komórkową, przez co glukoza zostaje uwięziona w komórce



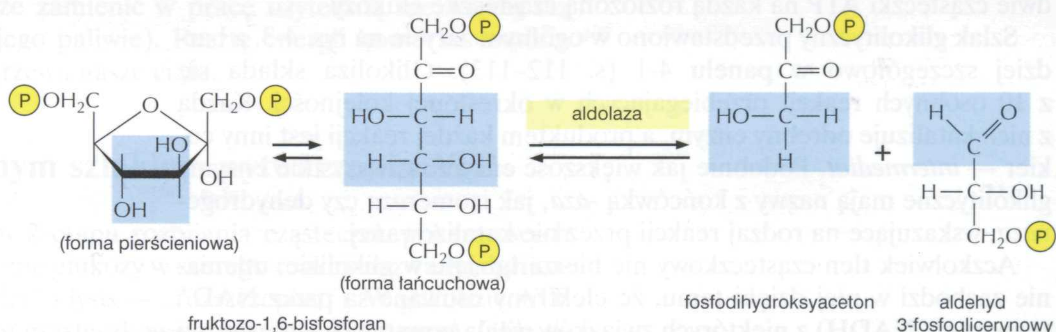
Reakcja 2 Łatwo odwracalne przestawienie w strukturze chemicznej (izomeryzacja), polegające na przemieszczeniu tlenu grupy karbonylowej z węgla 1 do węgla 2 w cząsteczce cukru, wskutek czego z aldozy powstaje ketoza (patrz panel 2-3, s. 56 - 57)



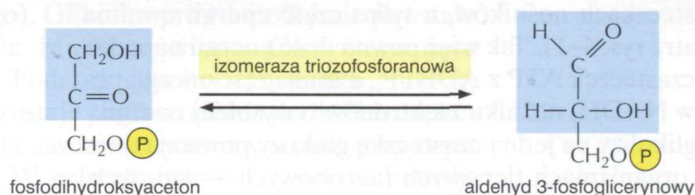
Reakcja 3 Fosforylacja nowej grupy hydroksylowej przy węglu 1 przez ATP jest przygotowaniem do utworzenia dwóch fosforanów cukru trójwęglowego. Wejście cukrów do glikolizy jest kontrolowane właśnie w tej reakcji, poprzez regulację aktywności enzymu *fosfofruktokinazy*



Reakcja 4 Rozszczepienie sześciowęglowego cukru daje dwie cząsteczki trójwęglowe. Dalszym przemianom w glikolizie może ulegać bezpośrednio jedynie aldehyd 3-fosfoglicerynowy.

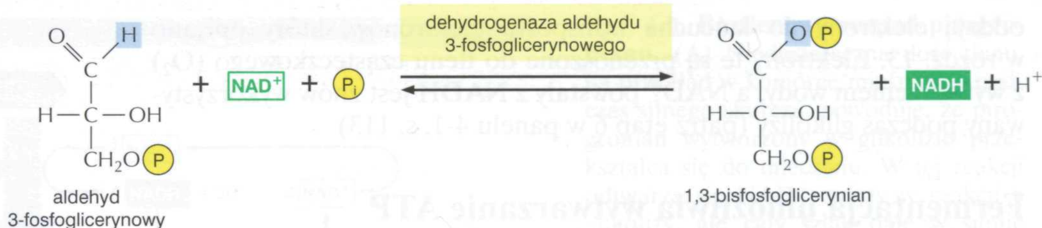


Reakcja 5 Drugi produkt reakcji 4, fosfodihydroksyaceton po izomeryzacji przechodzi w aldehyd 3-fosfoglicerynowy

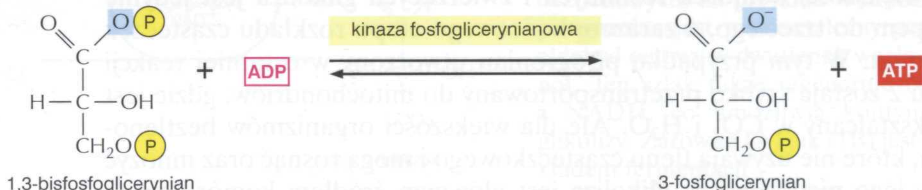


 Panel 4-1. **Szczegółowo przedstawione 10 reakcji glikolizy**

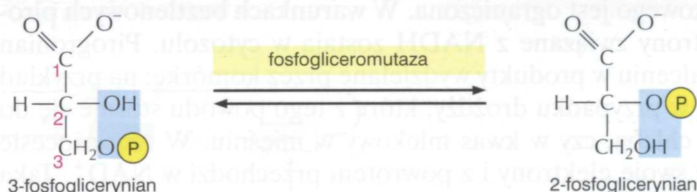
Reakcja 6 Dwie cząsteczki aldehydu 3-fosfoglicerynowego zostają utlenione. Zaczyna się faza glikolizy dostarczająca energii w postaci NADH i nowo utworzonego „wysokoenergetycznego", bezwodnikowego wiązania fosforanowego (patrz rys. 4-5)



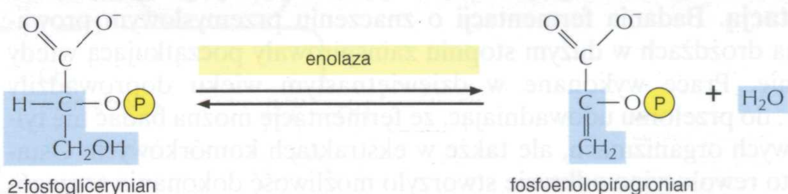
Reakcja 7 Utworzenie ATP przez przeniesienie na ADP grupy fosforanowej z jej wiązaniem „wysokoenergetycznym" otrzymanym w reakcji 6



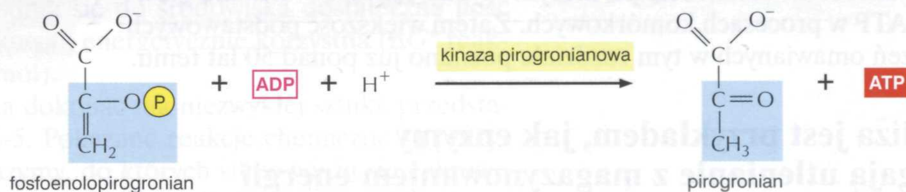
Reakcja 8 Pozostałe w 3-fosfoglicerynianie fosforanowe wiązanie estrowe, o stosunkowo małej swobodnej energii hydrolizy, zostaje przeniesione z węgla 3 na węgiel 2 i powstaje 2-fosfoglicerynian



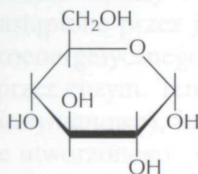
Reakcja 9 Usunięcie wody z 2-fosfoglicerynianu powoduje powstanie „wysokoenergetycznego" wiązania fosfoenolowego

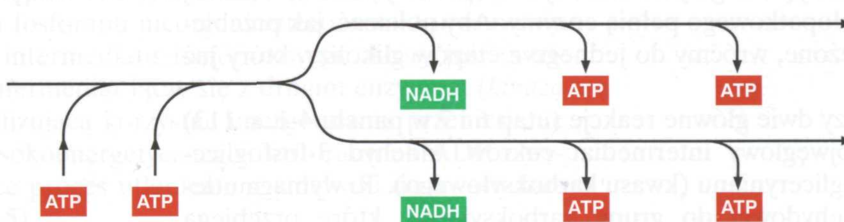


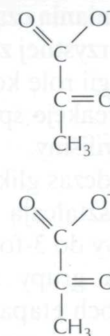
Reakcja 10 Przeniesienie na ADP grupy fosforanowej z jej „wysokoenergetycznym" wiązaniem, otrzymanym w reakcji 9, daje ATP i kończy glikolizę



WYNIK NETTO GLIKOLIZY







oprócz pirogronianu produktami netto są także dwie cząsteczki ATP i dwie cząsteczki NADH

oddają elektrony do łańcucha transportu elektronów, który opisano w rozdz. 13. Elektrony te są przenoszone do tlenu cząsteczkowego (O_2) z wytworzeniem wody, a NAD^+ powstały z NADH jest znów wykorzystywany podczas glikolizy (patrz etap 6 w panelu 4-1, s. 113)

Fermentacja umożliwia wytwarzanie ATP w nieobecności tlenu

Dla większości komórek roślinnych i zwierzęcych glikoliza jest jedynie wstępem do trzeciego, a zarazem końcowego etapu rozkładu cząsteczek pokarmu. W tym przypadku pirogronian utworzony w ostatniej reakcji etapu 2 zostaje szybko przetransportowany do mitochondriów, gdzie jest przekształcany w CO_2 i H_2O. Ale dla większości organizmów beztlenowych, które nie używają tlenu cząsteczkowego i mogą rosnąć oraz mnożyć się w jego nieobecności, glikoliza jest głównym źródłem komórkowego ATP. Dotyczy to również pewnych tkanek zwierzęcych, takich jak mięsień szkieletowy, który może bez przerwy funkcjonować nawet wtedy, gdy ilość tlenu cząsteczkowego jest ograniczona. W warunkach beztlenowych pirogronian i elektrony związane z NADH zostają w cytozolu. Pirogronian ulega przekształceniu w produkty wydzielane przez komórkę: na przykład w etanol i CO_2 w przypadku drożdży, które z tego powodu stosuje się do wyrobu piwa i chleba, czy w kwas mlekowy w mięśniu. W tym procesie NADH oddaje swoje elektrony i z powrotem przechodzi w NAD^+. Taka regeneracja NAD^+ jest niezbędna do trwałego przebiegu reakcji glikolizy (rys. 4-4).

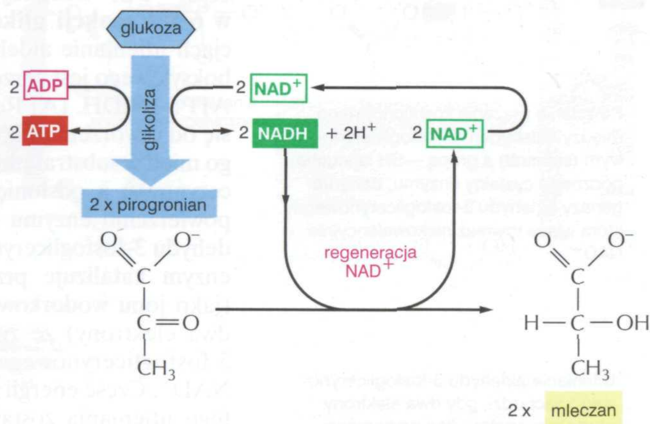
Beztlenowe szlaki energetyczne działające w opisany sposób nazwano **fermentacją**. Badania fermentacji o znaczeniu przemysłowym prowadzone na drożdżach w dużym stopniu zainspirowały początkującą wtedy biochemię. Prace wykonane w dziewiętnastym wieku doprowadziły w 1896 r. do przełomu udowadniając, że fermentację można badać nie tylko w żywych organizmach, ale także w ekstraktach komórkowych. Ostatecznie to rewolucyjne odkrycie stworzyło możliwość dokonania szczegółowej analizy procesu fermentacji, dzięki zbadaniu osobno każdej z jego reakcji. Połączenie w całość szlaku glikolitycznego w latach 1930 było wielkim sukcesem biochemii, po którym szybko nastąpiło uznanie głównej roli ATP w procesach komórkowych. Zatem większość podstawowych stwierdzeń omawianych w tym rozdziale poznano już ponad 50 lat temu.

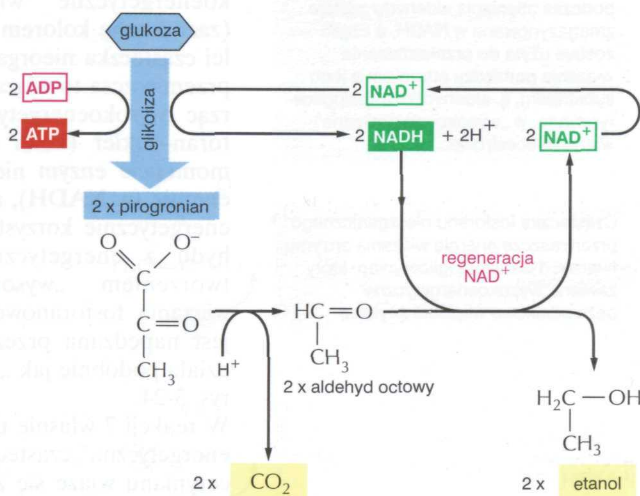
Pytanie 4-1. Na pierwszy rzut oka, fermentacja wydaje się nieobowiązującym dodatkiem do glikolizy. Wyjaśnij, dlaczego komórki rosnące w nieobecności tlenu nie powinny po prostu odrzucić pirogronianu jako zbędnego produktu. Jaki produkt pochodzący z glukozy powinien gromadzić się w komórkach, które w procesie fermentacji nie potrafią wytwarzać ani mleczanu, ani etanolu.

Glikoliza jest przykładem, jak enzymy sprzęgają utlenianie z magazynowaniem energii

Poprzednio użyliśmy analogii do „koła łopatkowego", aby wyjaśnić, jak komórki wykorzystują za pomocą enzymów energię użyteczną, uzyskaną z utleniania cząsteczek organicznych, do sprzęgania reakcji energetycznie niekorzystnej z reakcją energetycznie korzystną (patrz rys. 3-24); w naszej analogii rolę koła łopatkowego pełnią enzymy. Aby pokazać, jak przebiegają reakcje sprzężone, wróćmy do jednego z etapów glikolizy, który już omówiliśmy.

Podczas glikolizy dwie główne reakcje (etap 6 i 7 w panelu 4-1, s. 113) przekształcają trójwęglowy intermediat cukrów, aldehyd 3-fosfoglicerynowy do 3-fosfogliceryninu (kwasu karboksylowego). To wymaga utlenienia grupy aldehydowej do grupy karboksylowej, które przebiega w dwóch etapach. W reakcji sumarycznej zostaje uwolniona ilość energii swobodnej wystarczająca do przekształcenia cząsteczki ADP w ATP i przeniesienia dwóch elektronów z aldehydu do NAD^+ z wytworzeniem





Rys. 4-4. Beztlenowy rozpad pirogronianu. (A) Niedostateczna ilość tlenu, na przykład w komórce mięśniowej podczas silnego skurczu, powoduje, że pirogronian wytworzony w glikolizie przekształca się do mleczanu. W tej reakcji odtwarza się NAD^+ zużyty w reakcji 6 glikolizy, ale cały szlak daje w sumie znacznie mniej energii niż całkowite utlenianie. (B) W niektórych organizmach beztlenowych, na przykład w drożdżach, pirogronian jest przekształcany poprzez aldehyd octowy w dwutlenek węgla i etanol. Ten szlak także regeneruje NAD^+ z NADH, co umożliwia kontynuację glikolizy. Zarówno (A) jak i (B) jest przykładem fermentacji

NADH, przy czym jeszcze uwalnia się do środowiska dostateczna ilość ciepła, aby uczynić reakcję całkowitą energetycznie korzystną ($\Delta G°$ reakcji całkowitej wynosi –12,5 kJ/mol).

Środki, dzięki którym można dokonać tak niezwykłej sztuki, przedstawiono schematycznie na rys. 4-5. Pokazane reakcje chemiczne są precyzyjnie kierowane przez dwa enzymy, do których silnie wiążą się cukrowe intermediaty. W rzeczywistości, jak to wyszczególniono na rys. 4-5, pierwszy z enzymów (*dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego*) tworzy krótkotrwałe wiązanie kowalencyjne z aldehydem za pośrednictwem swojej reaktywnej grupy —SH i katalizuje jego utlenianie jeszcze w czasie, gdy jest on związany. Następnie reaktywne wiązanie enzym–substrat zostaje zastąpione przez jon fosforanu nieorganicznego w celu utworzenia „wysokoenergetycznego" intermediatu fosforanowego, który jest uwalniany przez enzym. Ten intermediat łączy się z drugim enzymem (*kinazą fosfoglicerynianową*), katalizującą korzystne energetycznie przeniesienie właśnie utworzonego „wysokoenergetycznego" fosforanu na ADP, z wytworzeniem ATP, kończące proces utlenieniem aldehydu do kwasu karboksylowego (patrz rys. 4-5).

Ten specyficzny proces utleniania pokazaliśmy z pewnymi szczegółami, ponieważ stanowi on przejrzysty przykład magazynowania energii w reakcjach sprzężonych enzymatycznie (rys. 4-6). Reakcje te (reakcja 6 i 7) są

(A)

aldehyd 3-fosfoglicerynowy

Powstanie wiązania kowalencyjnego między aldehydem 3-fosfoglicerynowym (substrat) a grupą —SH łańcucha bocznego cysteiny enzymu, dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego, która wiąże rownież niekowalencyjnie NAD^+

ENZYM —SH

NAD^+

REAKCJA 6

NADH + H^+

wiązanie „wysokoenergetyczne" (tioestrowe)

Utlenianie aldehydu 3-fosfoglicerynowego zachodzi, gdy dwa elektrony plus atom wodoru (jon wodorkowy, patrz rys. 3-28) są przenoszone z aldehydu 3-fosfoglicerynowego na związany NAD^+, tworząc NADH. Zatem część energii uwolnionej podczas utleniania aldehydu zostaje zmagazynowana w NADH, a część zostaje użyta do przekształcenia wiązania pomiędzy enzymem a jego substratem, tj. aldehydem 3-fosfoglicerynowym, w „wysokoenergetyczne" wiązanie tioestrowe

fosforan

Cząsteczka fosforanu nieorganicznego przemieszcza energię wiązania enzymu tworząc 1,3-bisfosfoglicerynian, który zawiera „wysokoenergetyczne" bezwodnikowe wiązanie acylowe

1,3-bisfosfoglicerynian

REAKCJA 7

ADENINA

RYBOZA

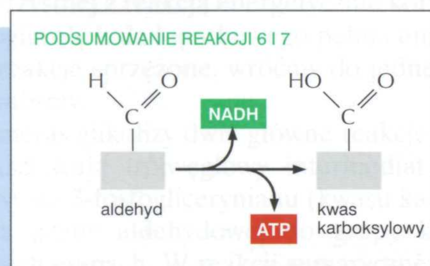
ADP

ATP

Przeniesienie fosforanu z jego wiązaniem wysokoenergetycznym na ADP daje ATP

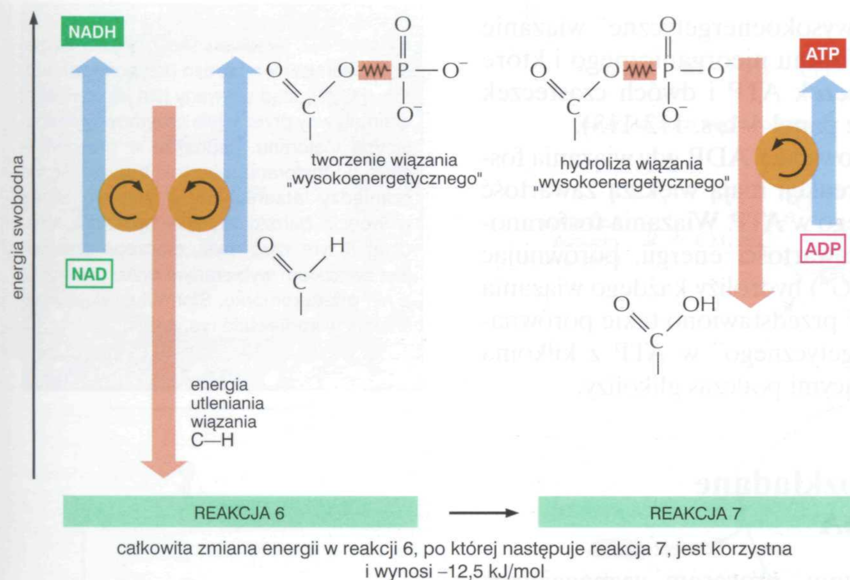
3-fosfoglicerynian

(B)



Duża część energii utleniania zostaje zmagazynowana w zaktywowanych nośnikach

Rys. 4-5. Magazynowanie energii w 6 i 7 reakcji glikolizy. W tych reakcjach utlenianie aldehydu do kwasu karboksylowego jest sprzężone z tworzeniem ATP i NADH. (A) Reakcja 6 rozpoczyna się od utworzenia wiązania kowalencyjnego między substratem (aldehyd 3-fosfoglicerynowy) a odsłoniętą grupą —SH na powierzchni enzymu (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego). Następnie enzym katalizuje przeniesienie wodoru (jako jonu wodorkowego — proton plus dwa elektrony) ze związanego aldehydu 3-fosfoglicerynowego do cząsteczki NAD^+. Część energii uwolnionej podczas tego utleniania zostaje wykorzystana do tworzenia cząsteczki NADH, a część do przekształcenia pierwotnego wiązania między enzymem a substratem w „wysokoenergetyczne" wiązanie tioestrowe (zaznaczone kolorem *czerwonym*). Z kolei cząsteczka nieorganicznego fosforanu przemieszcza to wiązanie z enzymu, tworząc „wysokoenergetyczne" wiązanie fosforan–cukier (kolor *czerwony*). W tym momencie enzym nie tylko magazynuje energię (w NADH), ale również sprzęga energetycznie korzystne utlenianie aldehydu z energetycznie niekorzystnym tworzeniem „wysokoenergetycznego" wiązania fosforanowego. Druga reakcja jest napędzana przez pierwszą, dlatego działa podobnie jak „koło łopatkowe" na rys. 3-24.
W reakcji 7 właśnie utworzona „wysokoenergetyczna" cząsteczka, 1,3-bisfosfoglicerynianu wiąże się z drugim enzymem, kinazą fosfoglicerynianową. Reaktywny fosforan zostaje przeniesiony na ADP; tworzy się cząsteczka ATP, a w utlenianym cukrze pozostaje wolna grupa kwasu karboksylowego. (B) Sumaryczne zestawienie całości przemian chemicznych zachodzących w reakcjach 6 i 7



Rys. 4-6. Schemat sprzężenia w 6 i 7 reakcji glikolizy, umożliwiającego powstanie NADH i ATP. Energia utleniania wiązania C—H zasila tworzenie NADH i „wysokoenergetycznego" wiązania fosforanowego. Następnie przez rozszczepienie wiązania „wysokoenergetycznego" zasila tworzenie ATP

Rys. 4-7. ***(niżej)*** **Wartości energetyczne niektórych wiązań fosforanowych.** Przeniesienie grupy fosforanowej z jakiejkolwiek cząsteczki 1 do jakiejkolwiek cząsteczki 2 jest korzystne energetycznie, jeśli standardowa zmiana energii swobodnej (ΔG^o) hydrolizy wiązania fosforanowego w cząsteczce 1 jest bardziej ujemna od energii hydrolizy wiązania fosforanowego cząsteczki 2. A zatem na przykład grupa fosforanowa z łatwością przechodzi z 1,3-bisfosfoglicerynianu do ADP tworząc ATP. Zauważ, że reakcję hydrolizy można interpretować jako przeniesienie grupy fosforanowej do wody

rodzaj wiązania fosforanowego	specyficzne przykłady pokazujące zmianę standardowej energii swobodnej (ΔG^o) podczas hydrolizy wiązania fosforanowego	ΔG^o HYDROLIZY (KJ/MOL)
wiązanie fosfoenolowe	fosfoenolopirogronian (patrz panel 4-1, str. 112-113)	−62,0
bezwodnikowe wiązanie z węglem	na przykład 1,3-bisfosfoglicerynian (patrz panel 4-1)	−49,0
wiązanie fosforanowe w fosfokreatynie	fosfokreatyna (zaktywowany nośnik magazynujący energię w mięśniu)	−43,0
bezwodnikowe wiązanie z fosforanem (bezwodnikowe wiązanie fosforanowe)	na przykład ATP, gdy ulega hydrolizie do ADP	−30,5
wiązanie fosfoestrowe	na przykład glukozo-6-fosforan (patrz panel 4-1)	−14.0

jedynymi reakcjami glikolizy, w których „wysokoenergetyczne" wiązanie fosforanowe powstaje bezpośrednio z fosforanu nieorganicznego i które odpowiadają za utworzenie dwóch cząsteczek ATP i dwóch cząsteczek NADH netto na cząsteczkę glukozy (patrz panel 4-1, s. 112-113).

Jak już wiemy, ATP może rzeczywiście powstać z ADP, gdy wiązania fosforanowe tworzące się w intermediatach reakcji mają większą zawartość energii od ostatniego wiązania fosforanowego w ATP. Wiązania fosforanowe można uszeregować pod względem zawartości energii, porównując zmianę standardowej energii swobodnej ($\Delta G°$) hydrolizy każdego wiązania rozszczepionego w tym procesie; na rys. 4-7 przedstawiono takie porównanie fosforanowego wiązania „wysokoenergetycznego" w ATP z kilkoma innymi wiązaniami fosforanowymi powstającymi podczas glikolizy.

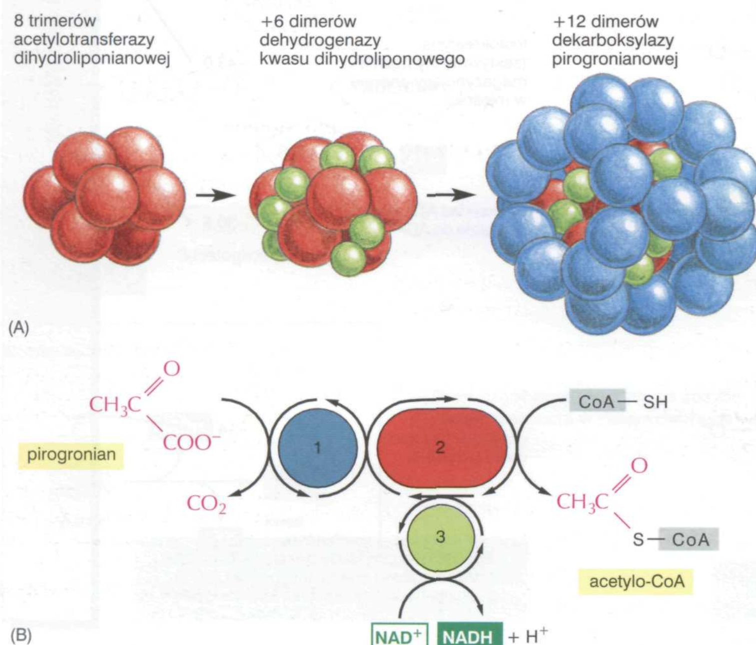
Pytanie 4-2. Arsenian (AsO_4^{3-}) pod względem chemicznym bardzo przypomina fosforan (PO_4^{3-}), stąd używany jest jako substrat alternatywny przez wiele enzymów wymagających fosforanu. Jednakże w przeciwieństwie do fosforanu, wiązanie bezwodnikowe pomiędzy arsenianem a węglem ulega w wodzie bardzo szybkiej hydrolizie. Wiedząc o tym rzuć myśl, dlaczego arsenian jest związkiem wybieranym przez zabójców, a nie przez komórkę. Sformułuj swoje wyjaśnienie w kontekście rys. 4-6.

Cukry i tłuszcze są stopniowo rozkładane w mitochondriach do acetylo-CoA

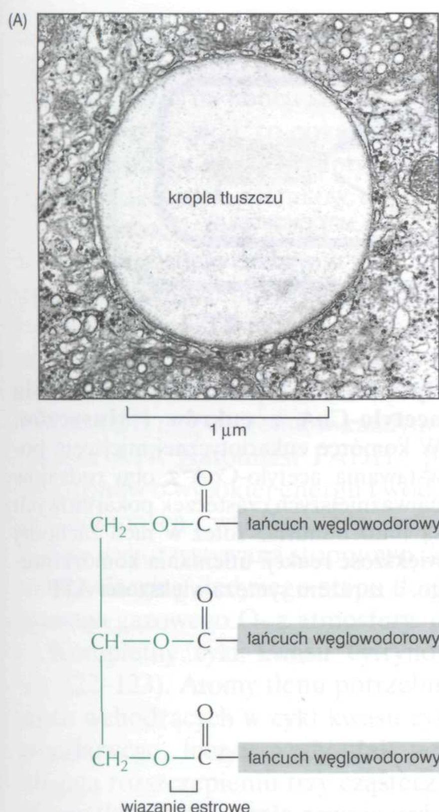
Teraz zajmiemy się 3 etapem katabolizmu, procesem wymagającym znacznej ilości tlenu cząsteczkowego (gazowego O_2). Uważamy, że na Ziemi atmosfera zawierająca tlen gazowy powstała dopiero 1–2 miliardy lat temu. Ponieważ obfitość form żywych istnieje na Ziemi już od 3,5 miliarda lat, sądzimy, że geneza reakcji zużywających tlen jest stosunkowo niedawna. Natomiast mechanizm wykorzystywany do wytwarzania ATP, pokazany na rys. 4-5, nie wymaga tlenu, a odpowiedniki tej doskonałej pary reakcji sprzężonych mogły pojawić się bardzo wcześnie w historii życia na Ziemi.

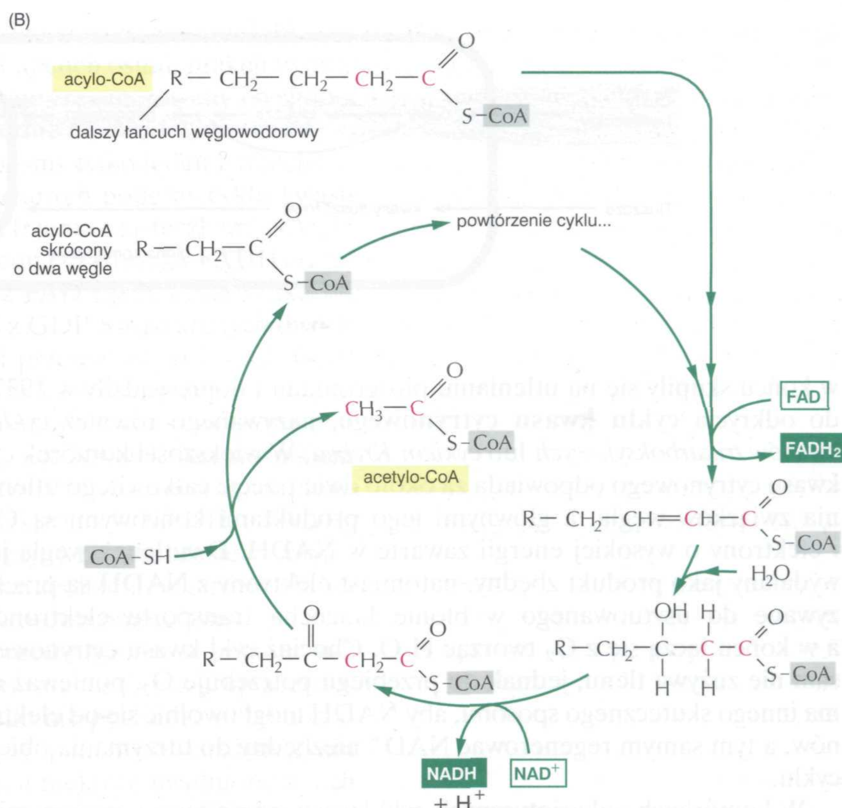
W metabolizmie tlenowym pirogronian powstający podczas glikolizy ulega szybko dekarboksylacji przez olbrzymi kompleks trzech enzymów nazwany *kompleksem dehydrogenazy pirogronianowej*. Produktami dekarboksylacji pirogronianu są: cząsteczka CO_2 (produkt zbędny), cząsteczka NADH i acetylo-CoA. Kompleks trzech enzymów znajduje się w mitochondriach komórek eukariotycznych; jego strukturę i sposób działania przedstawia ogólnie rys. 4-8.

Podobnie enzymy rozszczepiające kwasy tłuszczowe pochodzące z tłuszczów — wytwarzają acetylo-CoA w mitochondriach. Każda



Rys. 4-8. Utlenianie pirogronianu do acetylo-CoA i CO_2. (A) Struktura kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, zawierającego 60 łańcuchów polipeptydowych. Jest to przykład olbrzymiego kompleksu wieloenzymatycznego, w którym intermediaty reakcji są bezpośrednio przekazywane od jednego enzymu do drugiego. W komórkach eukariotycznych ta dehydrogenaza znajduje się w mitochondriach. (B) Reakcje prowadzone przez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej. W matriks mitochondrialnej kompleks ten przekształca pirogronian w acetylo-CoA, wytwarzając też NADH. Enzymy: 1 — *dekarboksylaza pirogronianowa*, 2 — *acetylotransferaza dihydroliponianowa*, 3 — *dehydrogenaza kwasu dihydroliponowego*, pokazane w (A); ich aktywności powiązane są w taki sposób, jak na rysunku





cząsteczka kwasu tłuszczowego (jako zaktywowana cząsteczka acylo-CoA) zostaje całkowicie rozbita w cyklu reakcji, które odcinają po dwa węgle na raz od jej końca karboksylowego, dając jedną cząsteczkę acetylo-CoA w każdym obrocie cyklu. W tym procesie powstaje również cząsteczka NADH i cząsteczka $FADH_2$ (rys. 4-9).

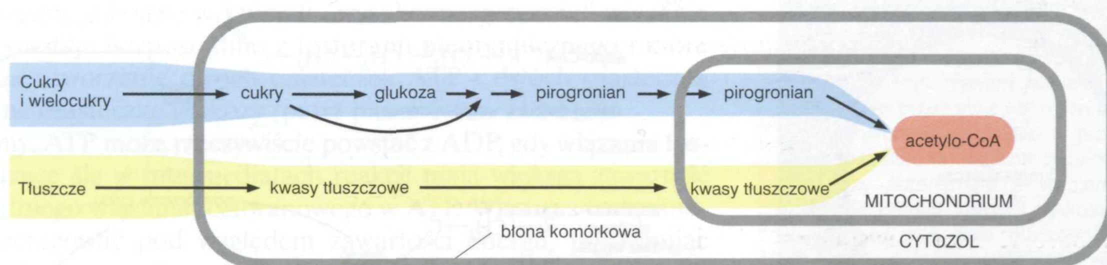
Rys. 4-9. Utlenianie kwasów tłuszczowych do acetylo-CoA. (A) Mikrografia elektronowa kropli lipidu w cytoplazmie (*u góry*) i struktura tłuszczów (*niżej*). Tłuszcze są triacyloglicerolami. Kolorem *zielonym* zaznaczono fragment glicerolowy, do którego przyłączone są wiązaniami estrowymi trzy cząsteczki kwasów tłuszczowych. Tłuszcze są nierozpuszczalne w wodzie i tworzą duże krople lipidowe w wyspecjalizowanych komórkach tłuszczowych (zwanych adipocytami), gdzie są magazynowane. (B) Cykl utleniania kwasów tłuszczowych. Cykl katalizowany jest w mitochondriach przez cztery enzymy działające kolejno. W każdym obrocie cyklu łańcuch kwasu tłuszczowego zostaje skrócony o dwa węgle (zaznaczone kolorem *czerwonym*) i powstaje jedna cząsteczka acetylo-CoA oraz po jednej cząsteczce NADH i $FADH_2$. (A dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)

Cukry i tłuszcze stanowią główne źródło energii dla większości organizmów niefotosyntetyzujących, w tym dla ludzi. Jednakże większość energii użytecznej, którą można by wydobyć z utleniania obu rodzajów produktów pokarmowych, pozostaje zmagazynowana w cząsteczkach acetylo-CoA, wytwarzanego przez dwa typy właśnie opisanych reakcji. Reakcje cyklu kwasu cytrynowego, w którym grupa acetylowa cząsteczki acetylo-CoA jest utleniana do CO_2 i H_2O, stanowią zatem główny ośrodek metabolizmu energetycznego organizmów tlenowych. U eukariotów wszystkie te reakcje zachodzą w mitochondriach — organellach, do których pirogronian i kwasy tłuszczowe są skierowywane w celu wytworzenia acetylo-CoA (rys. 4-10). Dlatego nie powinno być dla nas zaskoczeniem stwierdzenie, że w komórce zwierzęcej mitochondrium jest miejscem, gdzie powstaje ogromna większość ATP. Natomiast bakterie beztlenowe przeprowadzają wszystkie reakcje w jednym przedziale, mianowicie w cytozolu, w którym u bakterii umiejscowiony jest cykl kwasu cytrynowego.

Pytanie 4-3. Wiele reakcji katabolicznych i metabolicznych opiera się na działaniach podobnych, ale przebiegających w odwrotnym kierunku, na przykład reakcje hydrolizy i kondensacji przedstawione na rys. 3-22. To dotyczy także rozkładu i syntezy kwasów tłuszczowych. Czy na podstawie tego, co wiesz o mechanizmie rozszczepiania kwasów tłuszczowych, pokazanym na rys. 4-9, możesz oczekiwać, że znajdujące się w komórce kwasy tłuszczowe mają zwykle parzystą, czy nieparzystą liczbę atomów węgla?

Cykl kwasu cytrynowego dostarcza NADH przez utlenianie grupy acetylowej do CO_2

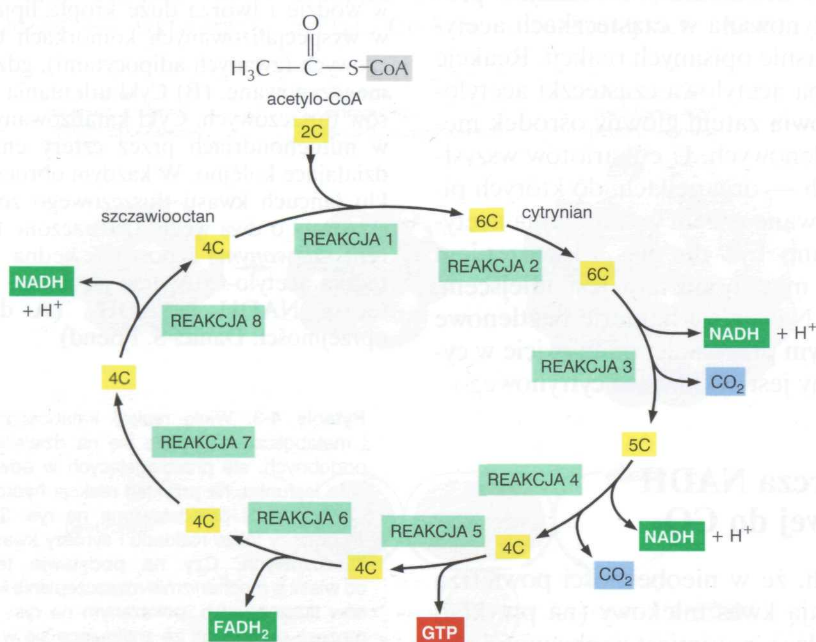
W XIX wieku biologowie zaobserwowali, że w nieobecności powietrza (warunki beztlenowe) komórki wytwarzają kwas mlekowy (na przykład w mięśniu) lub etanol (na przykład drożdże), natomiast w obecności powietrza (warunki tlenowe) zużywają one tlen i wytwarzają CO_2 oraz H_2O. Intensywne usiłowania by określić szlaki metabolizmu tlenowego,



Rys. 4-10. Główne szlaki tworzenia acetylo-CoA z cukrów i tłuszczów. W komórce eukariotycznej miejscem powstawania acetylo-CoA z obu rodzajów najważniejszych cząsteczek pokarmowych są mitochondria. Toteż w nich zachodzi większość reakcji utleniania komórkowego, a zarazem synteza większości ATP

w końcu skupiły się na utlenianiu pirogronianu i doprowadziły w 1937 r. do odkrycia **cyklu kwasu cytrynowego**, nazywanego również *cyklem kwasów trikarboksylowych* lub *cyklem Krebsa*. W większości komórek cykl kwasu cytrynowego odpowiada za około dwie trzecie całkowitego utleniania związków węgla, a głównymi jego produktami końcowymi są CO_2 i elektrony o wysokiej energii zawarte w NADH. Dwutlenek węgla jest wydalany jako produkt zbędny, natomiast elektrony z NADH są przekazywane do usytuowanego w błonie łańcucha transportu elektronów, a w końcu łączą się z O_2 tworząc H_2O. Chociaż cykl kwasu cytrynowego sam nie zużywa tlenu, jednak do przebiegu potrzebuje O_2, ponieważ nie ma innego skutecznego sposobu, aby NADH mógł uwolnić się od elektronów, a tym samym regenerować NAD^+ niezbędny do utrzymania obiegu cyklu.

W komórkach eukariotycznych cykl kwasu cytrynowego, mający miejsce wewnątrz mitochondriów, powoduje całkowite utlenianie atomów węgla acetylowych grup acetylo-CoA przemieniając je w CO_2. Grupa acetylowa nie jest utleniana bezpośrednio, ale przenoszona z acetylo-CoA do większej, czterowęglowej cząsteczki, *szczawiooctanu*, wskutek czego powstaje sześciowęglowy kwas karboksylowy, *kwas cytrynowy*, od którego pochodzi nazwa reakcji cyklu. Cząsteczka kwasu cytrynowego jest dalej stopniowo utleniana, a energia utleniania wykorzystywana do tworzenia



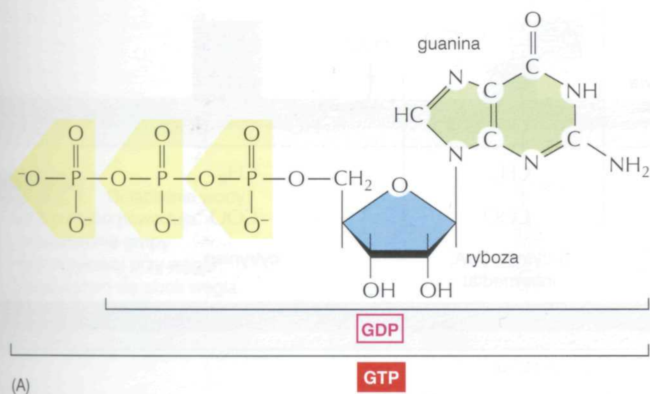
Rys. 4-11. Uproszczony schemat cyklu kwasu cytrynowego. Cykl rozpoczyna się od reakcji acetylo-CoA ze szczawiooctanem, w wyniku której powstaje cytrynian (kwas cytrynowy). Podczas każdego obrotu cyklu powstają dwie cząsteczki CO_2, jako produkt zbędny, oraz trzy cząsteczki NADH, jedna cząsteczka GTP i jedna cząsteczka $FADH_2$. Liczbę atomów węgla w każdym produkcie pośrednim podano w *żółtym kwadracie*

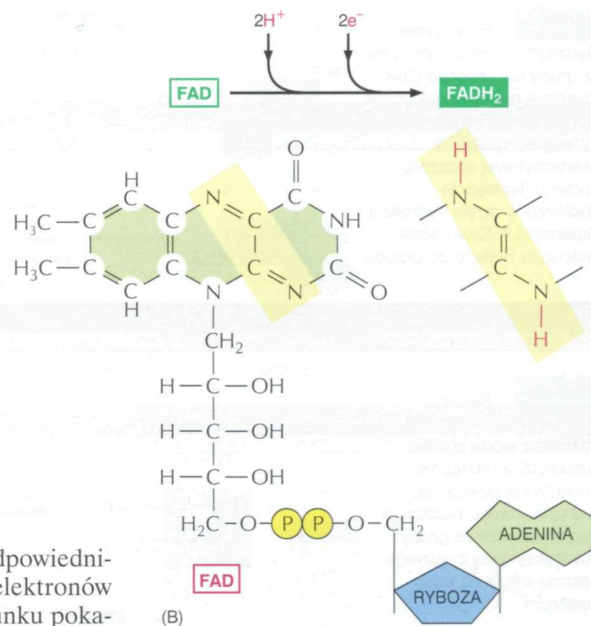
„wysokoenergetycznych" cząsteczek nośników, w większości w taki sam sposób, jaki opisano w przypadku glikolizy. Łańcuch ośmiu reakcji tworzy cykl, ponieważ na końcu szczawiooctan zostaje zregenerowany i wchodzi w nowy obrót cyklu, co pokazano schematycznie na rys. 4-11.

Jak wynika z rys. 4-11, dotychczas omówiliśmy tylko jeden z trzech rodzajów cząsteczek nośników energii wytwarzanych podczas cyklu kwasu cytrynowego, tj. parę NAD^+ – NADH. Poza trzema cząsteczkami NADH w każdym obrocie cyklu powstaje również jedna cząsteczka **$FADH_2$** (zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy) z FAD i jedna cząsteczka rybonukleotydu **GTP** (trifosforan guanozyny) z GDP. Strukturę tych dwóch aktywowanych cząsteczek nośników energii przedstawia rys. 4-12. GDP ma strukturę zbliżoną do ATP i przenosi swoją końcową grupę fosforanową do ADP, dzięki czemu w każdym cyklu powstaje dodatkowo jedna cząsteczka ATP. Natomiast $FADH_2$, podobnie jak NADH, jest nośnikiem elektronów o wysokiej energii i wodoru. Energia zmagazynowana w łatwo przenoszonych „wysokoenergetycznych" elektronach NADH i $FADH_2$ będzie wykorzystywana stopniowo do produkcji ATP w procesie *fosforylacji oksydacyjnej*, jedynego etapu tlenowego katabolizmu pokarmów, który wymaga gazowego O_2 z atmosfery, co już skrótowo omówiliśmy.

Kompletny cykl kwasu cytrynowego przedstawiono w panelu 4-2 (s. 122–123). Atomy tlenu potrzebne do otrzymania CO_2 z grup acetylowych wchodzących w cykl kwasu cytrynowego nie pochodzą z tlenu cząsteczkowego, lecz z wody. Jak pokazano w panelu, w każdym cyklu ulegają rozszczepieniu trzy cząsteczki wody, a niektóre uwolnione z nich atomy tlenu ostatecznie zostają wykorzystane do tworzenia CO_2.

Oprócz pirogronianu i kwasów tłuszczowych, także pewne aminokwasy przechodzą z cytozolu do mitochondriów, gdzie są również przekształcane do acetylo-CoA lub któregoś z innych intermediatów cyklu kwasu cytrynowego (patrz rys. 4-2). Tak więc w komórkach eukariotycznych mitochondrium jest tym centrum, do którego zmierzają wszystkie procesy energetyczne, niezależnie od tego, czy rozpoczynają się od cukrów, tłuszczów czy białek.





Rys. 4-12. Struktura GTP i $FADH_2$. (A) GTP i GDP są odpowiednikami ATP i ADP. (B) $FADH_2$ jest nośnikiem wodorów i elektronów o wysokiej energii, podobnie jak NADH i NADPH. Na rysunku pokazano go w formie utlenionej (FAD), a atomy przenoszące wodory zaznaczono *żółtym* prostokątem

Całość cyklu kwasu cytrynowego. Dwa węgle z acetylo-CoA, wchodzące w obrót tego cyklu (zaznaczone kolorem czerwonym) będą przekształcone w CO_2 w następnych obrotach cyklu: dwa węgle przekształcane w CO_2 w tym obrocie zaznaczono kolorem niebieskim

pirogronian → acetylo-CoA (2C) (NAD^+ → NADH + H^+; HS-CoA; CO_2)

Reakcja 1: acetylo-CoA + szczawiooctan (4C) + H_2O → cytrynian (6C) + HS-CoA

Reakcja 2: cytrynian (6C) → izocytrynian (6C)

Reakcja 3: izocytrynian (6C) → α-ketoglutaran (5C) (NAD^+ → NADH + H^+; CO_2)

Reakcja 4: α-ketoglutaran (5C) → bursztynylo-CoA (4C) (NAD^+, HS-CoA → NADH + H^+; CO_2)

Reakcja 5: bursztynylo-CoA (4C) + H_2O → bursztynian (4C) (GDP + P_i → GTP; HS-CoA)

Reakcja 6: bursztynian (4C) → fumaran (4C) (FAD → $FADH_2$)

Reakcja 7: fumaran (4C) + H_2O → jabłczan (4C)

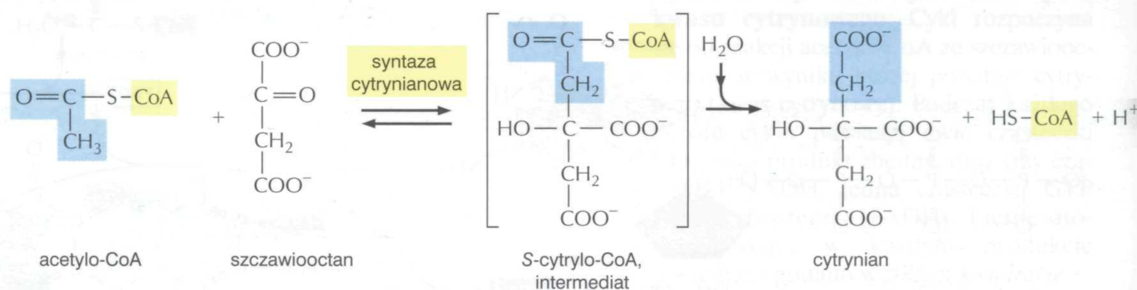
Reakcja 8: jabłczan (4C) → szczawiooctan (4C) (NAD^+ → NADH + H^+)

następny cykl

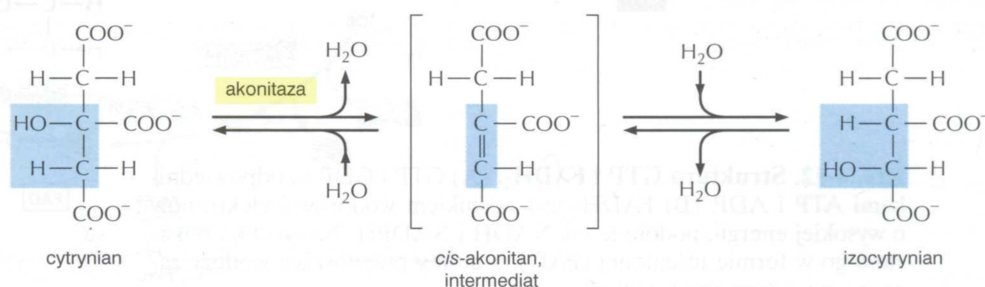
CYKL KWASU CYTRYNOWEGO

Poniżej pokazano szczegółowo osiem reakcji. W każdej z tych reakcji kolorem niebieskim zaznaczono fragment cząsteczki ulegający zmianie, a nazwę enzymu katalizującego tę reakcję umieszczono w żółtym polu

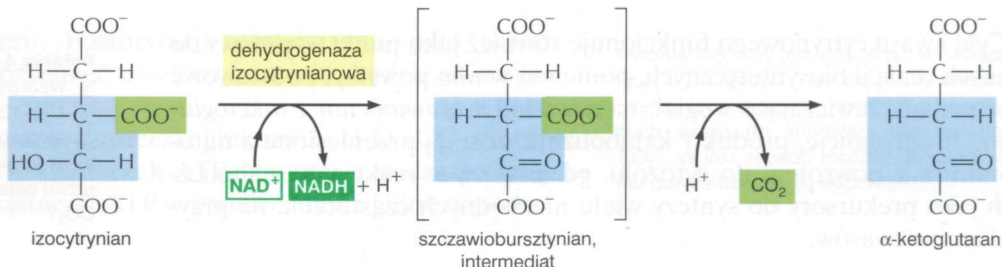
Reakcja 1 Po enzymatycznym usunięciu protonu z grupy CH_3 acetylo-CoA, ujemnie naładowana grupa CH_2^- tworzy wiązanie z węglem grupy karbonylowej szczawiooctanu. Następnie odłączony dzięki hydrolizie koenzym A (CoA) silnie napędza reakcję do przodu



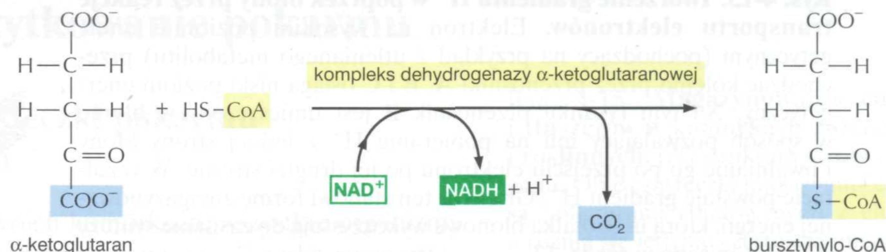
Reakcja 2 Reakcja izomeryzacji, w której najpierw woda zostaje usunięta, a następnie dołączona powtórnie, wskutek czego następuje przemieszczenie grupy hydroksylowej z jednego atomu węgla na atom sąsiedni



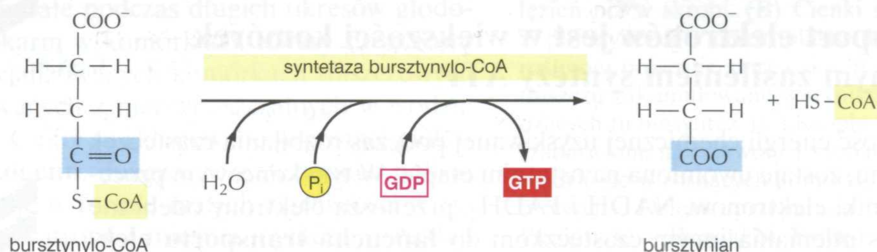
Reakcja 3 W pierwszej z czterech reakcji utleniania, które zachodzą w cyklu, węgiel związany z grupą hydroksylową zostaje przekształcony w grupę karbonylową. Nietrwały produkt pośredni traci CO_2, gdy jest jeszcze związany z enzymem



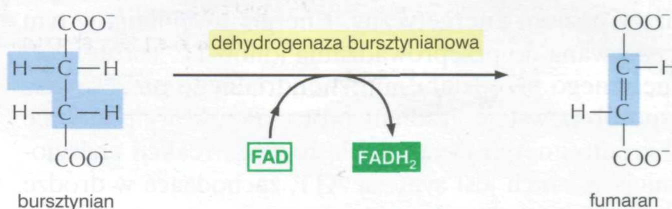
Reakcja 4 *Kompleks dehydrogenazy α-ketoglutaranowej* jest bardzo podobny do wielkiego kompleksu enzymatycznego przekształcającego pirogronian w acetylo-CoA (*dehydrogenazy pirogronianowej*). On również katalizuje utlenianie, podczas którego powstaje NADH, CO_2 i „wysokoenergetyczne" wiązanie tioestrowe z koenzymem A (CoA)



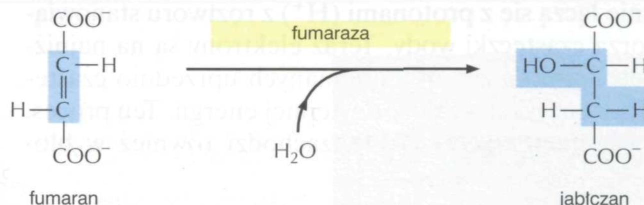
Reakcja 5 Cząsteczka fosforanu z roztworu zajmuje miejsce CoA, tworząc „wysokoenergetyczne" wiązanie fosforanowe z bursztynianem. Następnie ten fosforan zostaje przeniesiony do GDP i powstaje GTP. (W bakteriach i roślinach tworzy się w tej reakcji ATP)



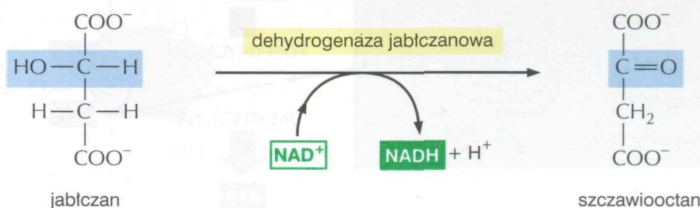
Reakcja 6 W trzeciej reakcji utleniania, zachodzącej w cyklu, FAD odbiera z bursztynianu dwa atomy wodoru



Reakcja 7 Dołączenie wody do fumaranu powoduje umieszczenie grupy hydroksylowej przy węglu znajdującym się obok węgla karboksylowego

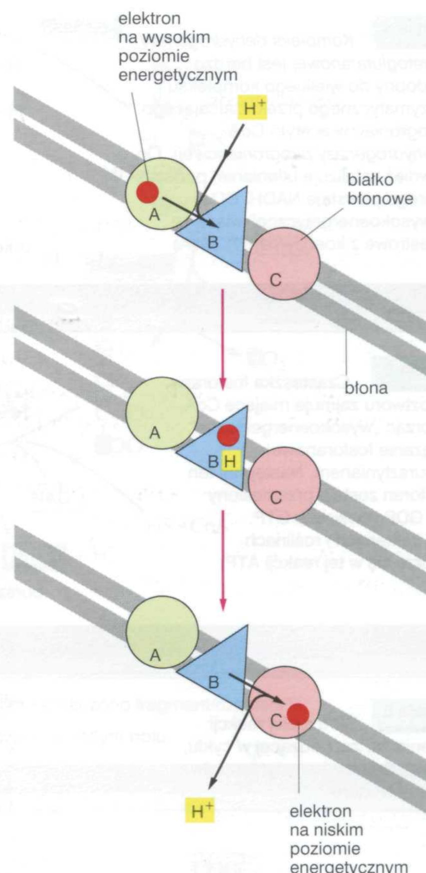


Reakcja 8 W ostatniej z czterech reakcji utleniania, zachodzących w cyklu, węgiel związany z grupą hydroksylową zostaje przekształcony w grupę karbonylową, dzięki czemu zostaje odtworzony szczawiooctan, potrzebny do reakcji 1



Cykl kwasu cytrynowego funkcjonuje również jako punkt wyjściowy do ważnych reakcji biosyntetycznych, ponieważ w nim powstają podstawowe intermediaty zawierające węgiel, na przykład *szczawiooctan* i *α-ketoglutaran*. Te substancje, produkty katabolizmu, zostają przeniesione z mitochondriów z powrotem do cytozolu, gdzie służą w reakcjach anabolicznych jako prekursory do syntezy wielu niezbędnych cząsteczek, na przykład aminokwasów.

Pytanie 4-4. Dlaczego patrząc na szczegóły wzorów chemicznych w panelu 4-2 (s. 122–123) sądzisz, że korzystne jest wiązanie grupy acetylowej najpierw do szkieletu węglowego, szczawiooctanu, jeszcze przed całkowitym utlenianiem obu węgli do CO_2?

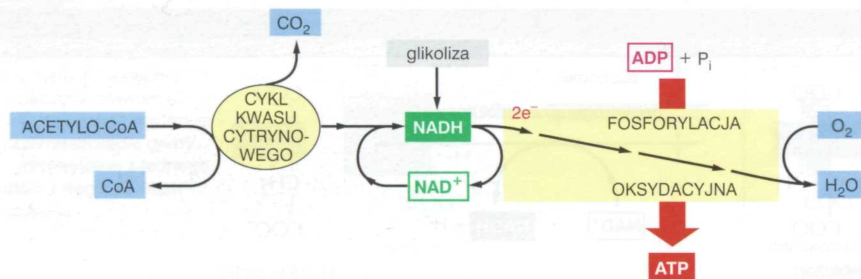


Rys. 4-13. Tworzenie gradientu H^+ w poprzek błony przez reakcje transportu elektronów. Elektron na wysokim poziomie energetycznym (pochodzący na przykład z utlenianego metabolitu) przechodząc kolejno przez przenośniki A, B i C osiąga niski poziom energetyczny. Na tym rysunku przenośnik B jest umieszczony w błonie w sposób pozwalający mu na pobieranie H^+ z jednej strony błony i uwalnianie go po przejściu elektronu po jej drugiej stronie. W rezultacie powstaje gradient H^+. Gradient ten stanowi formę zmagazynowanej energii, którą inne białka błonowe wykorzystują do zasilania syntezy ATP, co opisano w rozdz. 13

Transport elektronów jest w większości komórek głównym zasileniem syntezy ATP

Większość energii chemicznej uzyskiwanej podczas rozbijania cząsteczek pokarmu, zostaje uwolniona na ostatnim etapie. W tym końcowym procesie nośniki elektronów, NADH i $FADH_2$, przenoszą elektrony odebrane podczas utleniania innym cząsteczkom do **łańcucha transportu elektronów**, osadzonego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Gdy elektrony przepływają wzdłuż tego długiego łańcucha, utworzonego z cząsteczek wyspecjalizowanych w przyjmowaniu i oddawaniu elektronów, spadają na coraz to niższy poziom energetyczny. Energia uwalniana w tym procesie jest wykorzystywana do przeprowadzania jonów H^+ (protonów) przez błonę z wewnętrznego przedziału mitochondrialnego na zewnątrz (rys. 4-13). W ten sposób powstaje gradient protonowy, który podobnie jak bateria stanowi źródło energii do zasilania różnych reakcji energiochłonnych. Najważniejszą z nich jest synteza ATP, zachodząca w drodze fosforylacji ADP.

Na końcu łańcucha transportu elektronów są one przenoszone do cząsteczek tlenu gazowego (O_2, docierającego do mitochondriów dyfuzyjnie), które równocześnie łączą się z protonami (H^+) z roztworu stanowiącego środowisko i tworzą cząsteczki wody. Teraz elektrony są na najniższym poziomie energetycznym, a zatem z utlenianych uprzednio cząsteczek pokarmowych została uzyskana całość dostępnej energii. Ten proces, nazwany *fosforylacją oksydacyjną* (rys. 4-14), zachodzi również w bło-



Rys. 4-14. Końcowe etapy utleniania cząsteczek pokarmowych. Cząsteczki NADH i $FADH_2$ (nie pokazane) wytwarzane w cyklu kwasu cytrynowego oddają elektrony, które w rezultacie redukują tlen gazowy do wody. Większa część energii uwolnionej podczas skomplikowanego procesu transportu elektronów zachodzącego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (lub w błonie komórkowej bakterii) jest wykorzystywana jako siła napędowa do syntezy ATP

nach komórkowych bakterii. Fosforylacja oksydacyjna, jako jedno z najbardziej niezwykłych osiągnięć ewolucji komórki, będzie głównym tematem rozdz. 13.

W sumie, całkowite utlenianie cząsteczki glukozy do H_2O i CO_2 umożliwia komórce syntezę ok. 30 cząsteczek ATP. Natomiast podczas samej glikolizy powstają tylko 2 cząsteczki ATP w przeliczeniuna jedną cząsteczkę glukozy.

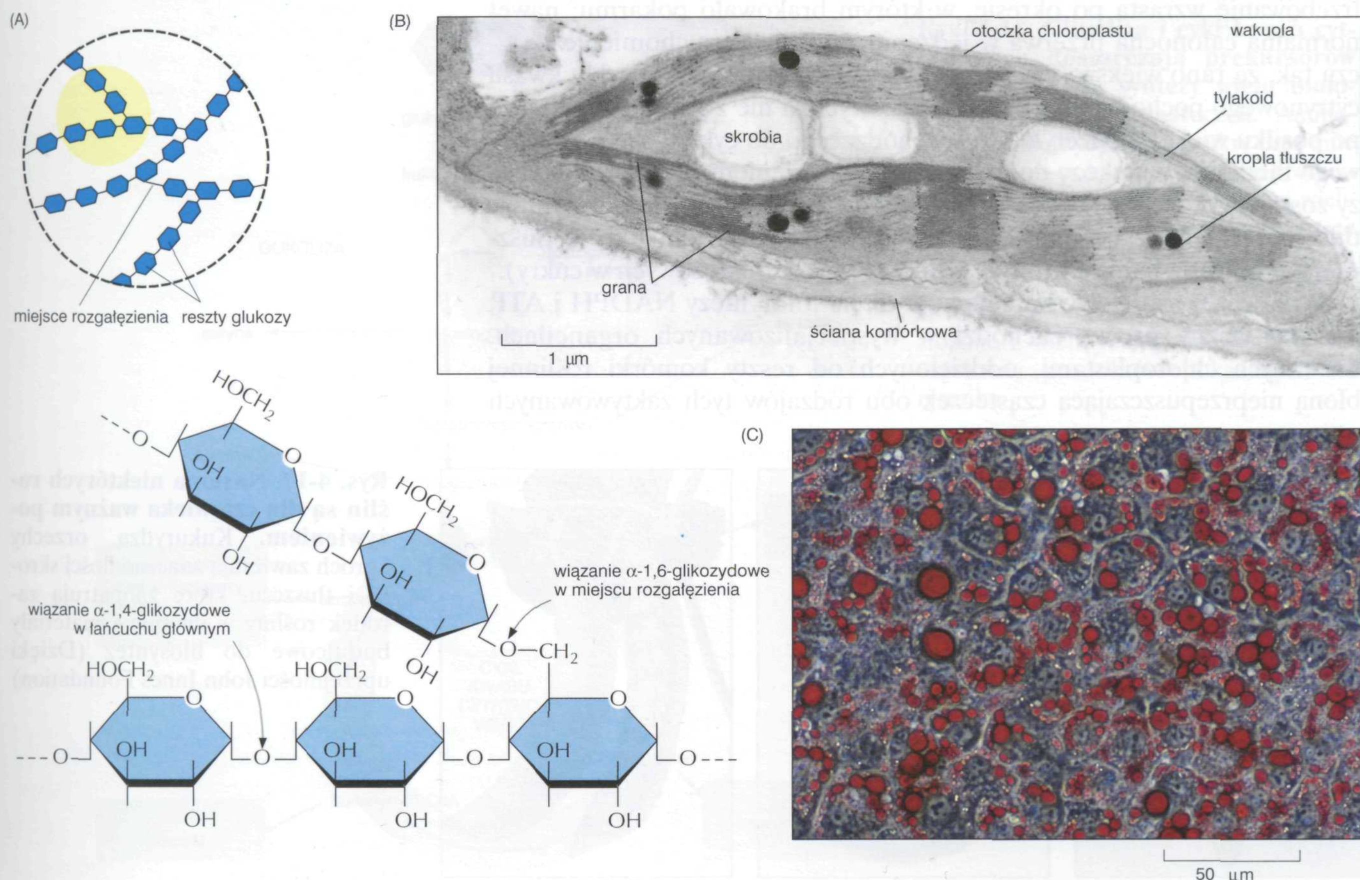
Pytanie 4-5. Czy jest coś złego w następującej wypowiedzi: „Tlen zużywany podczas utleniania glukozy w komórkach zwierzęcych wraca do atmosfery jako składnik CO_2". W jaki sposób możesz doświadczalnie potwierdzić swoją odpowiedź?

Magazynowanie i użytkowanie pokarmu

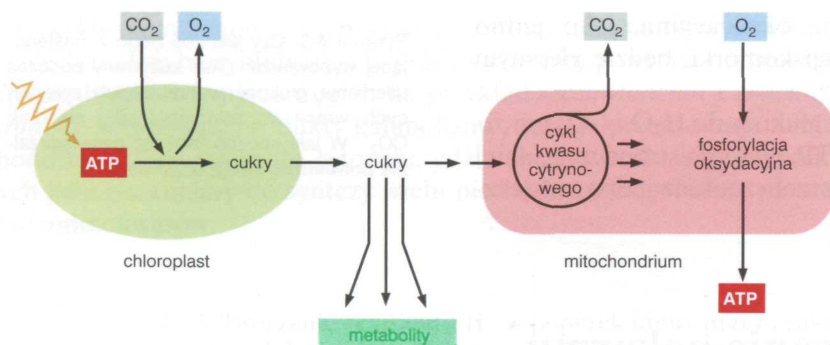
Organizmy odkładają cząsteczki pokarmu w specjalnych magazynach

Aby zachować biologiczny ład w swoich komórkach, wszystkie organizmy muszą stale odnawiać pulę ATP. Jednakże zwierzęta tylko okresowo mają dostęp do pokarmu, a rośliny muszą przeżyć całą noc bez światła słonecznego, a więc bez możliwości wytwarzania cukrów w procesie fotosyntezy.

Żeby więc wyrównać straty powstałe podczas długich okresów głodowania, zwierzęta przechowują pokarm w komórkach. Kwasy tłuszczowe magazynują przeważnie w wyspecjalizowanych komórkach tłuszczowych w postaci kropli tłuszczu, zbudowanych z nierozpuszczalnych w wodzie triacylogliceroli (patrz rys. 4-9A). Cukry są składowane w postaci glukozy, stanowiącej podjednostki **glikogenu**, dużego, rozgałęzionego polisacharydu (rys. 4-15), który występuje w formie małych ziarnistości w cytoplazmie wielu komórek, w tym wątroby i mięśnia. Synteza i rozkład



Rys. 4-15. Magazynowanie cukrów i tłuszczów w komórkach zwierzęcych i roślinnych. (A) struktura skrobi i glikogenu. Obie cząsteczki magazynują cukier; są polimerami zbudowanymi z glukozy, a różnią się jedynie częstością miejsc rozgałęzienia (obszar zaznaczony kolorem *żółtym*, pokazany niżej w powiększeniu). W glikogenie jest znacznie więcej rozgałęzień niż w skrobi. (B) Cienki skrawek z pojedynczego chloroplastu komórki roślinnej pokazuje ziarna skrobi i krople tłuszczu zakumulowane w wyniku zachodzących tu biosyntez. (C) Krople tłuszczu (zabarwione na czerwono) zaczynają gromadzić się w rosnących komórkach tłuszczowych. Dzięki uprzejmości: (B — K. Plaskitt; C — Ronald M. Evans)



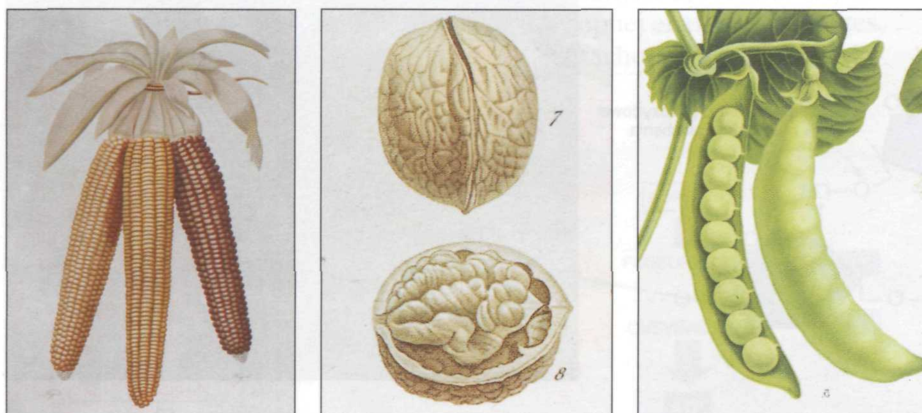
Rys. 4-16. W roślinach chloroplasty i mitochondria współpracują zaopatrując komórkę w metabolity i ATP

glikogenu podlegają szybkiej regulacji, zależnej od zapotrzebowania. Gdy potrzeba więcej ATP, niż może powstać z cząsteczek pokarmu pobieranych z krwi, komórka rozkłada glikogen w reakcji, w której powstaje glukozo-1-fosforan, uczestniczący w glikolizie.

Odkładany **tłuszcz** pod względem ilościowym ma o wiele większe znaczenie od glikogenu, po części dlatego, że podczas utleniania grama tłuszczu uwalnia się dwukrotnie więcej energii niż podczas utleniania grama glikogenu. Co więcej, glikogen w odróżnieniu od tłuszczu wiąże sporą ilość wody. To wszystko razem powoduje, że potrzeba sześciokrotnie większej rzeczywistej masy glikogenu do zmagazynowania takiej samej ilości energii, jaką zmagazynowałby tłuszcz. Dorosły człowiek przeciętnie gromadzi glikogen w ilości wystarczającej mniej więcej na dzień normalnej aktywności, natomiast jego zapas tłuszczu wystarczy prawie na miesiąc. Jeżeli naszym głównym paliwem zapasowym zamiast tłuszczu byłby glikogen, masa ciała wzrosłaby przeciętnie o ok. 27 kg.

Większość tłuszczu magazynujemy w tkance tłuszczowej, z której jest on w razie potrzeby uwalniany do krwi, na użytek innych komórek. Zapotrzebowanie wzrasta po okresie, w którym brakowało pokarmu; nawet normalna całonocna przerwa w jedzeniu powoduje uruchomienie tłuszczu tak, że rano większość acetylo-CoA wprowadzonego do cyklu kwasu cytrynowego pochodzi z kwasów tłuszczowych, a nie z glukozy. Jednakże po posiłku większość acetylo-CoA wchodzącego do cyklu kwasu cytrynowego bierze się z glukozy dostarczonej z pożywieniem, a nadmiar glukozy zostaje wykorzystany do uzupełnienia zapasów glukozy lub do syntezy tłuszczów. (Komórki zwierzęce z łatwością przekształcają cukry w tłuszcze, nie potrafią natomiast przekształcić kwasów tłuszczowych w cukry).

Wprawdzie rośliny wytwarzają w procesie fotosyntezy NADPH i ATP, ale ten ważny proces zachodzi w wyspecjalizowanych organellach, nazwanych chloroplastami, oddzielonych od reszty komórki roślinnej błoną nieprzepuszczającą cząsteczek obu rodzajów tych zaktywowanych



Rys. 4-17. Nasiona niektórych roślin są dla człowieka ważnym pożywieniem. Kukurydza, orzechy i groch zawierają znaczne ilości skrobi i tłuszczu, które zaopatrują zarodek rośliny w energię i materiały budulcowe do biosyntez (Dzięki uprzejmości John Innes Foundation)

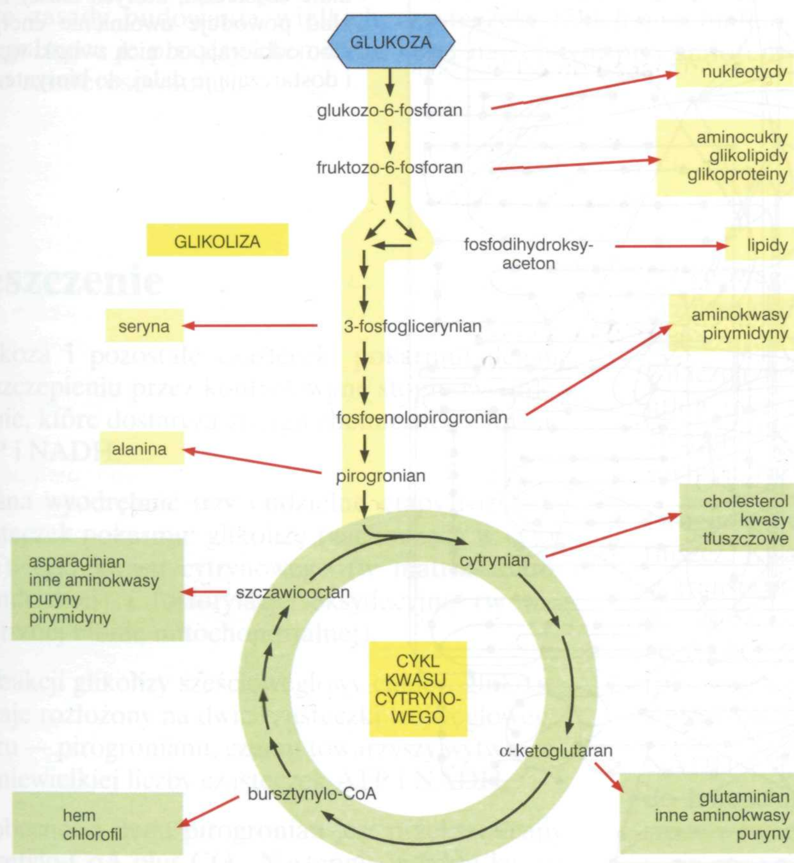
nośników energii. Co więcej, wiele komórek roślinnych nie może wytwarzać własnych cukrów ani ATP, ponieważ nie ma chloroplastów, jak np. komórki korzeni. Dlatego większość wytworzonego przez siebie ATP rośliny zawdzięczają eksportowi cukrów z chloroplastów do mitochondriów, które są we wszystkich komórkach roślinnych. Najwięcej ATP potrzebnego roślinom powstaje więc w mitochondriach, z których jest on wysyłany do pozostałych przedziałów komórki, do czego wykorzystywane są takie same szlaki tlenowego rozszczepiania cukrów, jakich używają organizmy niefotosyntetyzujące (rys. 4-16). Podczas dnia, w okresie największej wydajności fotosyntetycznej, chloroplasty przekształcają część wytworzonych cukrów w tłuszcze i w **skrobię**, polimer glukozy analogiczny do glikogenu zwierząt. Tłuszcze roślinne są triacyloglicerolami, tak samo jak zwierzęce, a różnią się jedynie typami przeważających kwasów tłuszczowych. Tłuszcz i skrobia są magazynowane w chloroplastach jako zapasowe źródła energii, uruchamiane podczas okresu ciemności (rys. 4-15B).

Zarodki znajdujące się w nasionach muszą żyć kosztem zapasowych źródeł energii przez dłuższy czas; dopiero po wykiełkowaniu, gdy rozwiną się liście, mogą one korzystać ze światła słonecznego. Z tego powodu nasiona roślin często zawierają bardzo duże ilości tłuszczów i skrobi, co czyni je głównym źródłem pokarmu dla zwierząt, a także dla nas (rys. 4-17).

Pytanie 4-6. Po przyjrzeniu się strukturom cukrów i kwasów tłuszczowych wyjaśnij, kierując się intuicją, dlaczego utlenianie cukru daje prawie o połowę mniej energii niż utlenianie równoważnej suchej masy kwasu tłuszczowego.

Wiele szlaków biosyntezy zaczyna się od glikolizy lub cyklu kwasu cytrynowego

Katabolizm zarówno uwalnia energię dla komórki, jak i wytwarza elementy, z których budowane są różne inne cząsteczki komórki (rys. 3-3). Dotychczas kładliśmy nacisk raczej na udostępnianie energii niż na za-



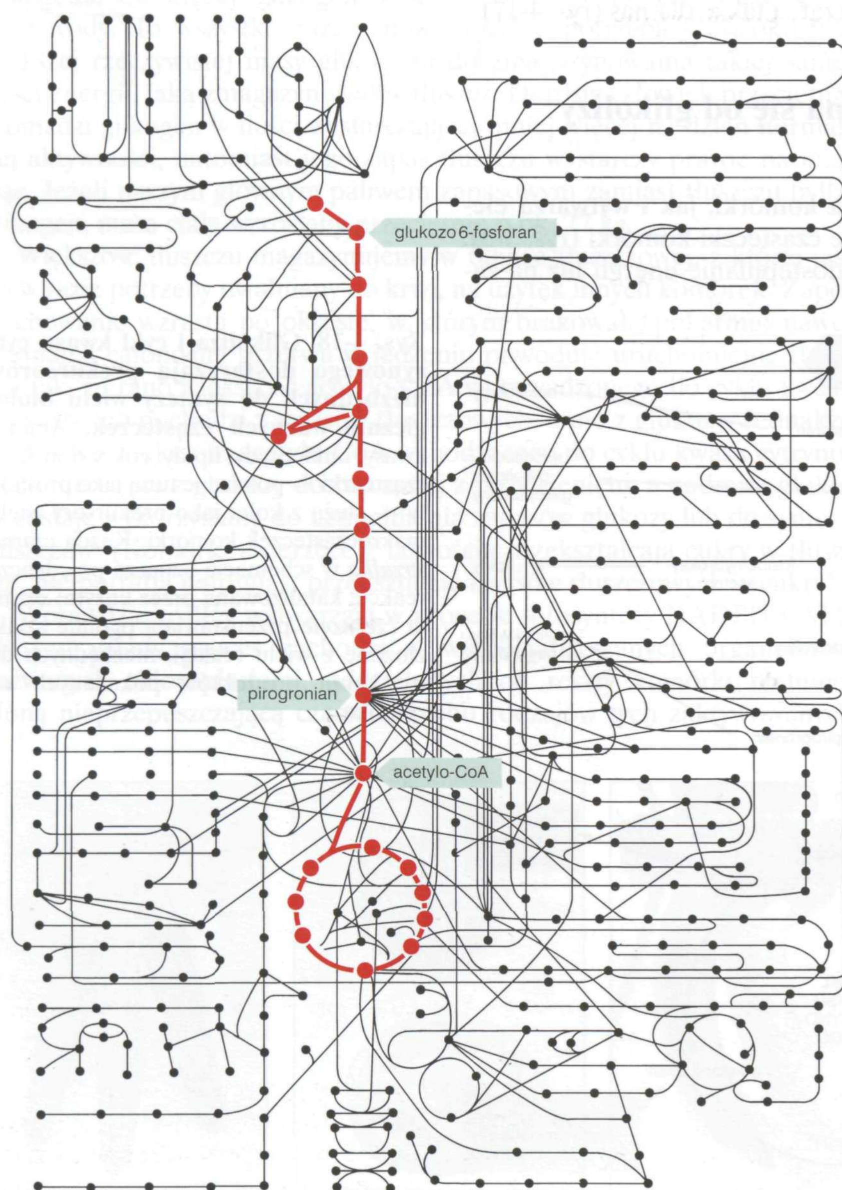
Rys. 4-18. Glikoliza i cykl kwasu cytrynowego dostarczają prekursorów niezbędnych do syntezy wielu biologicznie ważnych cząsteczek. Aminokwasy, nukleotydy, lipidy, cukry oraz inne cząsteczki — pokazane tutaj jako produkty — służą z kolei jako prekursory wielu makrocząsteczek komórki. Każda *czarna strzałka* w schemacie oznacza pojedynczą reakcję katalizowaną przez enzym; *strzałki czerwone* przedstawiają ogólnie szlaki złożone z wielu reakcji, niezbędnych do uzyskania produktów pokazanych na rysunku

pewnienie materiałów wyjściowych do biosyntez. A przecież wiele intermediatów tworzonych podczas glikolizy i cyklu kwasów trikarboksylowych jest również odciąganych przez inne enzymy i wykorzystywanych do syntezy aminokwasów, nukleotydów, lipidów i innych małych cząsteczek organicznych potrzebnych komórce. Pewien pogląd na złożoność tych procesów można sobie wyrobić na podstawie rys. 4-18, ilustrującego różne odgałęzienia od głównych reakcji katabolicznych prowadzące do biosyntez.

Istnienie w komórce tak wielu rozgałęzionych szlaków wymaga, aby wybór każdego odgałęzienia był dokładnie regulowany, o czym zaraz powiemy.

Metabolizm jest zorganizowany i regulowany

Rysunek 4-19, który jest „mapą" przedstawiającą tylko niektóre szlaki enzymatyczne w komórce, pomoże nam zrozumieć zawiłości komórki jako maszyny chemicznej. Na schemacie zaznaczono intensywnym kolo-



Rys. 4-19. Glikoliza i cykl kwasu cytrynowego stanowią centrum metabolizmu. Na schemacie pokazano ok. 500 reakcji metabolicznych zachodzących w typowej komórce, współdziałających z glikolizą i cyklem kwasu cytrynowego — zaznaczonymi kolorem *czerwonym*. Inne reakcje albo doprowadzają do wspomnianych dwóch głównych szlaków małe cząsteczki, których dalszy rozkład powoduje uwolnienie energii, albo odbierają od nich związki węgla i dostarczają je dalej, do biosyntez

rem czerwonym glikolizę i cykl kwasu cytrynowego. Jest więc rzeczą oczywistą, że dotychczasowy tekst opisujący metabolizm komórkowy dotyczył jedynie drobnego ułamka chemii komórki.

Wszystkie te reakcje zachodzą w komórce, której średnica jest mniejsza od 0,1 mm, a każda z nich wymaga odrębnego enzymu. Jak wynika z rys. 4-19, ta sama cząsteczka często może należeć do wielu różnych szlaków. Na przykład pirogronian jest substratem dla co najmniej pół tuzina rozmaitych enzymów, a każdy z nich modyfikuje go chemicznie w inny sposób. Jeden enzym przekształca pirogronian w acetylo-CoA, drugi — w szczawiooctan; trzeci enzym zmienia pirogronian w aminokwas alaninę, czwarty — w mleczan i tak dalej. Wszystkie te odmienne szlaki współzawodniczą o tę samą cząsteczkę pirogronianu, a jednocześnie trwa podobne współzawodnictwo o tysiące innych małych cząsteczek. Można więc przypuszczać, iż cały ten system musi być tak precyzyjnie wyważony, że najmniejsza nieprawidłowość, na przykład chwilowa zmiana diety, powinna być katastrofą.

Jednak w rzeczywistości równowaga metaboliczna komórki jest zdumiewająco stabilna. Każdorazowo, gdy tylko równowaga zostanie naruszona, komórka reaguje tak, aby przywrócić stan początkowy. Podczas głodu lub choroby komórka potrafi przystosować się i nadal funkcjonować. Wiele rodzajów mutacji może uszkodzić lub nawet wyeliminować poszczególne szlaki reakcji, a jednak komórka utrzyma się przy życiu pod warunkiem, że zostanie zaspokojone pewne minimum jej potrzeb. Dzieje się tak ponieważ precyzyjny układ *mechanizmów kontrolnych* reguluje i koordynuje szybkość przebiegu wszystkich reakcji w komórce. W ostatecznym efekcie te mechanizmy kontrolne opierają się na niezwykłych zdolnościach białek do zmian ich kształtu i chemicznego reagowania pod wpływem najbliższego środowiska, dzięki którym białka mogą podlegać regulacji. Reguły wyjaśniające zasady budowania wielkich cząsteczek, takich jak białka, oraz regulujące je procesy chemiczne będą następnym przedmiotem naszego zainteresowania.

Pytanie 4-7. Cykliczny szlak reakcji wymaga, aby materiał wyjściowy został zregenerowany i udostępniony na końcu każdego cyklu. Dlaczego cykl kwasu cytrynowego istnieje i działa dalej, skoro składniki cyklu kwasu cytrynowego są „podbierane" jako elementy budulcowe używane w różnych reakcjach metabolicznych?

Streszczenie

- Glukoza i pozostałe cząsteczki pokarmu ulegają rozszczepieniu przez kontrolowane stopniowe utlenianie, które dostarcza energii chemicznej w formie ATP i NADH.
- Można wyodrębnić trzy oddzielne etapy rozkładu cząsteczek pokarmu: glikolizę (zachodzącą w cytozolu), cykl kwasu cytrynowego (w matriks mitochondrialnej) i fosforylację oksydacyjną (w wewnętrznej błonie mitochondrialnej).
- W reakcji glikolizy sześciowęglowy cukier, glukoza, zostaje rozłożony na dwie cząsteczki trójwęglowego cukru — pirogronianu, czemu towarzyszy wytwarzanie niewielkiej liczby cząsteczek ATP i NADH.
- W obecności tlenu pirogronian jest przekształcany w acetylo-CoA plus CO_2. Następnie w cyklu kwasu cytrynowego grupa acetylowa acetylo-CoA ulega przekształceniu w CO_2 i H_2O. W komórkach eukariotycznych reakcje te zachodzą w mitochondriach. Znaczna ilość energii uwolnionej podczas reakcji utleniania zostaje zmagazynowana w nośnikach energii — NADH i $FADH_2$ — jako elektrony na wysokim poziomie energetycznym.
- Drugim głównym źródłem energii w pokarmie jest tłuszcz. Kwasy tłuszczowe wytwarzane z tłuszczów są transportowane do mitochondriów i tam utleniane do cząsteczek acetylo-CoA. Z kolei cząsteczki acetylo-CoA są dalej utleniane przez cykl kwasu cytrynowego, tak samo jak acetylo-CoA pochodzący z pirogronianu.
- NADH i $FADH_2$ oddają przenoszone elektrony do łańcucha transportu elektronów znajdującego się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, gdzie seria przeniesień elektronów zostaje później wy-

korzystana jako siła napędowa do tworzenia ATP. W tym procesie fosforylacji oksydacyjnej (opisanej w rozdz. 13) zostaje wykorzystana większość energii uzyskanej podczas rozkładania cząsteczek pokarmu.

- Komórki magazynują cząsteczki w postaci specjalnych substancji zapasowych. Zwierzęta przechowują glukozę w formie glikogenu, a rośliny w formie skrobi; natomiast zarówno zwierzęta, jak i rośliny magazynują pokarm w postaci tłuszczów. Substancje zapasowe wytworzone przez rośliny są głównym źródłem pokarmu dla zwierząt, w tym także dla człowieka.
- Cząsteczki przyjmowane w pożywieniu służą nie tylko jako źródło energii metabolicznej, lecz także jako surowiec do biosyntez. Stąd wiele intermediatów glikolizy i cyklu kwasu cytrynowego stanowi punkty wyjściowe dla szlaków syntezy białek, kwasów nukleinowych i innych wyspecjalizowanych cząsteczek w komórce.
- Wiele tysięcy rozmaitych reakcji przebiegających jednocześnie w komórce jest ściśle skoordynowane, co umożliwia jej przystosowanie i ciągłość funkcjonowania w bardzo różnych warunkach narzucanych przez środowisko zewnętrzne.

Hasła

acetylo-CoA
ADP, ATP
cykl kwasu cytrynowego
FAD, $FADH_2$
fermentacja
fosforylacja oksydacyjna
GDP, GTP
glikogen
glikoliza
glukoza
łańcuch transportu elektronów
NAD^+, NADH
pirogronian
skrobia
tłuszcz

Pytania

Pytanie 4-8. Utlenianie cząsteczek cukrów przez komórkę przebiega według ogólnej reakcji:



$C_6H_{12}O_6$ (glukoza) $+ 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ + energia

Które z następujących zdań są prawdziwe? Wyjaśnij odpowiedź.

A. Całość uzyskanej energii ma postać ciepła.
B. Energia nigdy nie jest uzyskiwana w postaci ciepła.
C. Energię otrzymuje się dzięki utlenianiu atomów węgla.
D. Podana wyżej reakcja dostarcza komórce istotną dla niej wodę.
E. Reakcja w komórce zachodzi wielostopniowo.
F. Utlenianie cząsteczek cukrów na wielu etapach odbywa się z udziałem tlenu.
G. Niektóre organizmy przeprowadzają reakcję odwrotną.
H. Komórki mogą rosnąć w nieobecności tlenu i bez wytwarzania CO_2.

Pytanie 4-9. Nadzwyczaj czułe urządzenie (jeszcze nie skonstruowane) pokazuje, że jeden z atomów węgla oddanych z ostatnim tchnieniem Karola Darwina znalazł sobie miejsce w twojej krwi, gdzie tworzy on element cząsteczki hemoglobiny. Podaj sugestię, w jaki sposób ów atom węgla mógłby zawędrować od Darwina do ciebie i wymień przez jakie cząsteczki mógłby ten atom przechodzić po drodze.

Pytanie 4-10. Komórki drożdży rosną zarówno w obecności tlenu cząsteczkowego (tlenowo) jak i w jego nieobecności (beztlenowo). W którym środowisku mogłyby one według ciebie rosnąć lepiej? Wyjaśnij odpowiedź.

Pytanie 4-11. Komórki mięśni podczas ruchu potrzebują dużej ilości ATP jako paliwa dla aparatów kurczliwych. Te komórki zawierają w dużym stężeniu fosfokreatynę (pokazaną na rys. 4-7). Dlaczego ten związek nadaje się do magazynowania energii? Umotywuj swoją odpowiedź, korzystając z informacji podanej na rys. 4-7.

Pytanie 4-12. Identyczne szlaki tworzące skomplikowaną sekwencję reakcji glikolizy, pokazane w panelu 4-1 (s. 112–113), wykryto w większości żywych komórek, od bakterii do człowieka. Jednakże można sobie wyobrazić niezliczone mechanizmy alternatywnych reakcji chemicznych, które pozwoliłyby na utlenianie cząsteczek cukrów i w zasadzie mogłyby przejąć funkcje glikolizy. Omów ten fakt w kontekście ewolucji.

Pytanie 4-13. Przyjmij, że komórka zwierzęca jest sześcianem, którego bok ma długość 10 mm. W komórce znajduje się 10^9 cząsteczek ATP, które są zużywane co minutę. ATP jest regenerowany podczas utleniania cząsteczek glukozy. Po jakim czasie komórka zużyje taką ilość tlenu gazowego, która równa się jej objętości? (Pamiętaj, że jeden mol zawiera $6 \cdot 10^{23}$ cząsteczek. Jeden mol gazu ma objętość 22,4 litra).

Pytanie 4-14. W warunkach panujących w komórce energia swobodna kilku pierwszych reakcji glikolizy (panel 4-1, s. 112–113) ma wartość

reakcja 1 $\Delta G = -33{,}5$ kJ/mol
reakcja 2 $\Delta G = -2{,}5$ kJ/mol

reakcja 3 $\Delta G = -22,2$ kJ/mol

reakcja 4 $\Delta G = -1,3$ kJ/mol

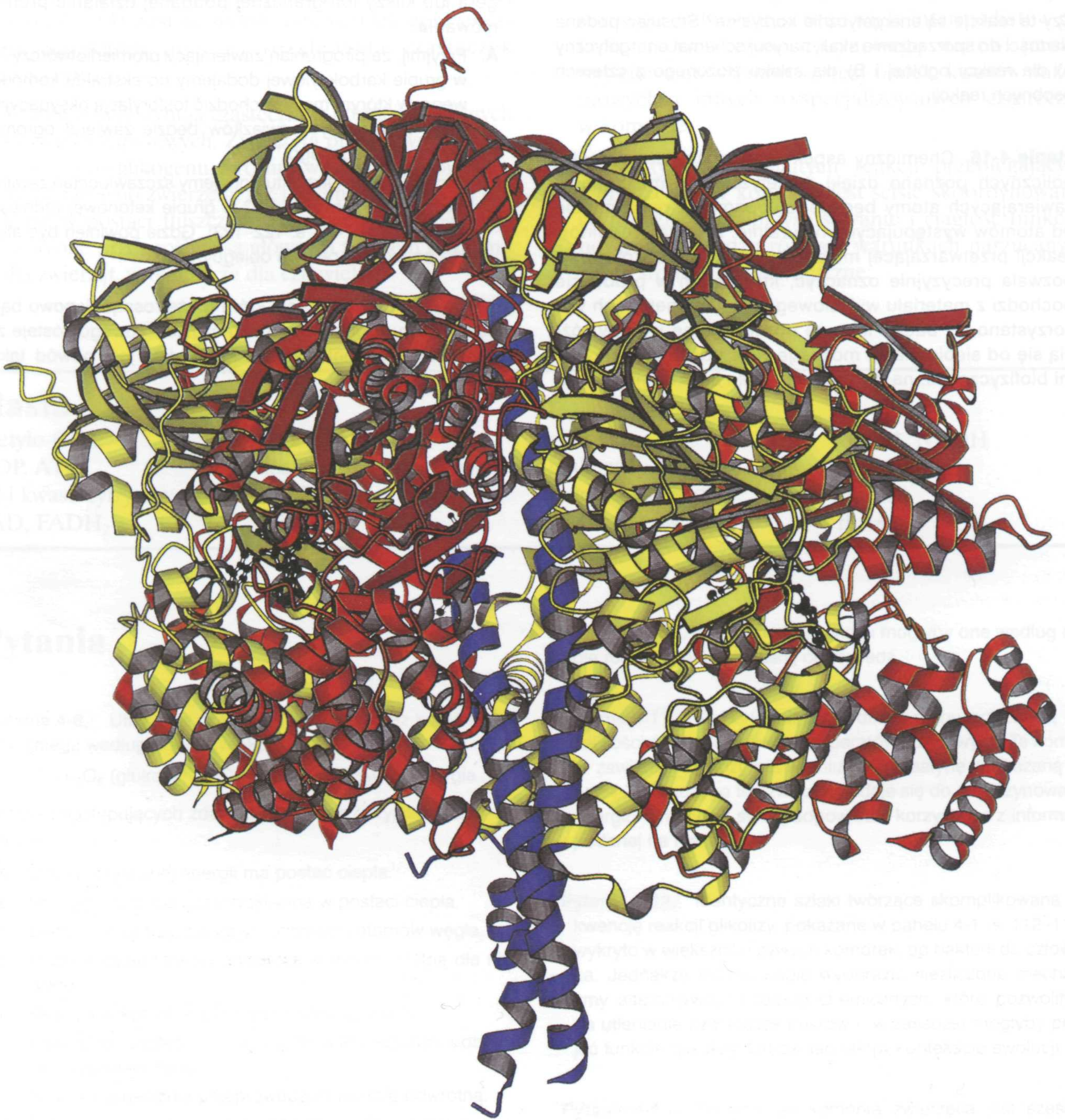
Czy te reakcje są energetycznie korzystne? Stosując podane wartości do sporządzenia skali, narysuj schemat energetyczny A) dla reakcji ogólnej i B) dla szlaku złożonego z czterech osobnych reakcji.

Pytanie 4-15. Chemiczny aspekt większości reakcji metabolicznych poznano dzięki syntetyzowaniu metabolitów zawierających atomy będące izotopami, które różnią się od atomów występujących naturalnie. Analiza produktów reakcji przetwarzającej metabolity znakowane izotopowo pozwala precyzyjnie oznaczyć, który atom w produkcie pochodzi z materiału wyjściowego. W tych metodach wykorzystano do badań fakt, że poszczególne izotopy różnią się od siebie masą; można je więc odróżnić technikami biofizycznymi, na przykład stosując spektrometrię masową. Co więcej, niektóre izotopy są promieniotwórcze, stąd można je z łatwością wykryć za pomocą licznika Geigera lub kliszy fotograficznej poddanej działaniu promieniowania.

A. Przyjmij, że pirogronian zawierający promieniotwórczy ^{14}C w grupie karboksylowej dodajemy do ekstraktu komórkowego, w którym może zachodzić fosforylacja oksydacyjna. Który z powstałych związków będzie zawierał ogromną większość dodanego ^{14}C?

B. Przyjmij, że do ekstraktu dodajemy szczawiooctan zawierający promieniotwórczy ^{14}C w grupie ketonowej (odniesienie do panelu 4-2, s. 122–123). Gdzie powinien być atom ^{14}C po jednym pełnym obiegu cyklu?

Pytanie 4-16. W komórce, która może rosnąć tlenowo bądź beztlenowo, w obecności tlenu cząsteczkowego zostaje zahamowana fermentacja. Zasugeruj, jaki jest powód takiej obserwacji.



Podstawową postacią obiegu energii chemicznej w komórce jest ATP, wytwarzany w mitochondriach przez niezwykłą białkową maszynę, nazywaną syntazą ATP. Część tej maszyny, omówionej szczegółowo w rozdz. 13, zbudowana jest z wielu podjednostek i przypomina kształtem okrągły lizak bez patyka. Zmienia ona konformację ok. 30 razy na sekundę, tworząc podczas każdej zmiany 3–4 cząsteczek ATP. Na rysunku przedstawiono w formie uproszczonej przestrzenną strukturę atomową tego kompleksu białkowego, którą określono szczegółowo stosując krystalografię rentgenowską. (Dzięki uprzejmości: John Walker © *Nature*)

5

Struktura i funkcje białek

Białka stanowią podstawowy składnik suchej masy komórki. Kiedy analizujemy komórkę stosując mikroskop elektronowy bądź też badamy jej aktywność elektryczną lub biochemiczną, w gruncie rzeczy obserwujemy białka. Nie są one jednak tylko budulcem komórek, lecz realizują również prawie wszystkie ich funkcje. Enzymy na przykład stanowią w komórce skomplikowane obszary molekularne umożliwiające przeprowadzenie szeregu reakcji chemicznych. Białka osadzone w błonie komórkowej tworzą kanały i pompy, które kontrolują przejście małych cząsteczek do wnętrza i na zewnątrz komórki. Niektóre białka przenoszą informacje z jednej komórki do drugiej, podczas gdy inne przekazują sygnały z błony komórkowej do jądra poszczególnych komórek. Jeszcze inne spełniają funkcje mikroskopijnych molekularnych maszyn z ruchomymi częściami: na przykład *kinezyna* przemieszcza organelle w obrębie cytoplazmy; *topoizomeraza* potrafi rozplątać splecioną cząsteczkę DNA. Inne wyspecjalizowane białka pełnią funkcje przeciwciał, toksyn, hormonów, cząsteczek zapobiegających zamarzaniu, elastycznych włókien, wzmocnień mechanicznych lub źródeł luminescencji. Aby móc zrozumieć, jak działają geny, jak kurczą się mięśnie, jak nerwy przewodzą elektryczność, jak rozwijają się embriony lub funkcjonują nasze ciała, musimy najpierw poznać białka. Niektóre przełomowe odkrycia stanowiące podstawę obecnej wiedzy o białkach zestawiono w tab. 5-1.

Różnorodność funkcji białek (panel 5-1, s. 135) wynika z olbrzymiej liczby odmiennych struktur przestrzennych, jakie mogą one przyjmować: funkcja jest bowiem następstwem struktury. Dlatego też rozpoczniemy opis tych szczególnych makrocząsteczek od przedstawienia ich struktur przestrzennych i właściwości warunkowanych tymi strukturami. W drugiej części rozdziału omówimy, jak działają białka: jak enzymy katalizują reakcje chemiczne, jak białka wypełniają funkcje molekularnych przełączników i jak białka generują spójny ruch. W rozdziale tym w trzech oddzielnych panelach, na s. 160–165, przedstawiono również metody rozbijania komórek, oczyszczania białek i wyznaczania struktury białka.

Tabela 5-1. Przełomowe odkrycia stanowiące podstawę obecnej wiedzy o białkach

1838	**Berzelius** zaproponował termin „białko” (ang. protein z grec. proteios — podstawowy) dla złożonej substancji bogatej w azot organiczny, występującej w komórkach wszystkich zwierząt i roślin.
1819–1904	Odkryto większość z 20 aminokwasów występujących w białkach.
1864	**Hoppe-Seyler** przeprowadził krystalizację białka, które nazwał hemoglobiną.
1894	**Fischer** zaproponował analogię w postaci modelu klucza i zamka do zobrazowania oddziaływań enzym–substrat.
1897	**Buchner i Buchner** wykazali, że ekstrakt z komórek drożdży może prowadzić fermentację sacharozy do dwutlenku węgla i etanolu, co zalicza się obecnie do podstaw enzymologii.
1926	**Sumner** przeprowadził krystalizację ureazy w czystej postaci, udowadniając, że białka wykazują aktywność katalityczną enzymów; **Svedberg** skonstruował pierwszą ultrawirówkę laboratoryjną i zastosował ją do wyznaczenia dokładnej masy cząsteczkowej hemoglobiny.
1933	**Tiselius** wprowadził elektroforezę jako metodę rozdzielenia roztworu białek.
1934	**Bernal i Crowfoot** zaprezentowali pierwszy szczegółowy rentgenogram, uzyskany dla kryształów enzymu pepsyny.
1942	**Martin i Synge** wprowadzili chromatografię, technikę obecnie szeroko stosowaną do rozdzielania białek.
1951	**Pauling** i **Corey** zaproponowali strukturę helikalnej konformacji łańcucha zbudowanego z L-aminokwasów — α helisy oraz strukturę harmonijki β, których obecność stwierdzono później w wielu białkach.
1955	**Sanger** zakończył analizę sekwencji aminokwasowej insuliny, pierwszego białka o poznanej sekwencji aminokwasów.
1956	**Ingram** wprowadził metodę „odcisku palca białka” (ang. protein fingerprint), dzięki której wykazał, że różnica między hemoglobiną sierpowatą i hemoglobiną prawidłową polega na zamianie jednego aminokwasu.
1960	**Kendrew** uzyskał pierwszy szczegółowy obraz struktury białka (mioglobina z nasienia wieloryba) o rozdzielczości 0,2 nm, a **Perutz** zaproponował strukturę hemoglobiny o większej rozdzielczości.
1963	**Monod, Jacob i Changeux** stwierdzili, że wiele enzymów podlega regulacji poprzez allosteryczne zmiany ich konformacji.

Struktura przestrzenna i budowa białek

Struktura i właściwości chemiczne każdego białka powstały i uległy utrwaleniu w ciągu miliardów lat ewolucji. Dlatego może nie zaskakuje fakt, że z chemicznego punktu widzenia białka są cząsteczkami najbardziej skomplikowanymi pod względem budowy i wyrafinowanymi pod względem funkcji. Rozpoczniemy od rozważań, w jaki sposób umiejscowienie każdego aminokwasu w długim łańcuchu aminokwasowym tworzącym białko warunkuje określoną strukturę przestrzenną tego białka. Zrozumienie budowy białka na poziomie atomowym pozwoli nam następnie przedstawić, jak określona struktura przestrzenna białka warunkuje z kolei jego funkcje.

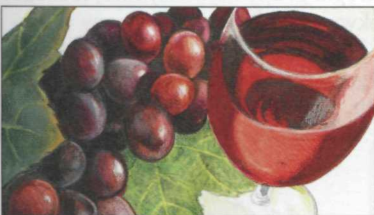
Strukturę przestrzenną białka określa jego sekwencja aminokwasowa

Jak już przedstawiono w rozdz. 2, w białkach występuje 20 różnych aminokwasów, każdy o odmiennych właściwościach chemicznych. **Cząsteczka białka** utworzona jest z długiego łańcucha tych aminokwasów, a każdy z nich łączy z sąsiednim wiązanie peptydowe (rys. 5-1).

Sekwencja atomów powtarzająca się wzdłuż tego łańcucha nazywa się **szkieletem polipeptydowym**. Do niego przyłączone są różne **łańcuchy boczne** aminokwasów, czyli części aminokwasów, które nie uczestniczą w tworzeniu wiązań peptydowych i nadają im unikatowe właściwości (rys. 5-2). Niektóre z nich są niepolarne i hydrofobowe (awersja do wody), inne obdarzone ładunkiem dodatnim lub ujemnym, niektóre reaktywne, inne niereaktywne i tak dalej. Budowę i właściwości 20 aminokwasów wchodzących w skład białek przedstawiono w panelu 2-5 (s. 62–63), a na rys. 5-3 zestawiono je wraz ze skrótami nazw. Każde białko ma unikatową sekwencję aminokwasową, dokładnie taką samą w przypadku różnych jego cząsteczek. Obecnie znanych jest wiele tysięcy

ENZYMY

funkcja: Kataliza tworzenia lub rozpadu wiązań kowalencyjnych



przykłady: Żywe komórki zawierają tysiące różnych enzymów, z których każdy katalizuje (przyspiesza) jedną określoną reakcję, m.in.: *syntetaza tryptofanowa* – syntezę aminokwasu tryptofanu; *pepsyna* – rozkład spożytych białek w żołądku; *karboksylaza rybulozobisfosforanu* – przekształcanie dwutlenku węgla w cukry przez rośliny; *polimeraza DNA*-syntezę DNA; *kinaza białkowa*–przyłączanie grupy fosforanowej do cząsteczki białka

BIAŁKA STRUKTURALNE

funkcja: Stanowią mechaniczną podporę komórek i tkanek



przykłady: Na zewnątrz komórek: *kolagen* i *elastyna* są powszechnymi składnikami substancji międzykomórkowej, a także tworzą włókna w ścięgnach i więzadłach. Wewnątrz komórek: *tubulina* tworzy długie, sztywne mikrotubule, *aktyna*–filamenty aktynowe stanowiące podstawę i podporę błony komórkowej; *α-keratyna* – włókna wzmacniające komórki nabłonka oraz jest głównym białkiem włosów i rogów

BIAŁKA TRANSPORTUJĄCE

funkcja: Przenoszą małe cząsteczki lub jony



przykłady: W krwiobiegu *albumina surowicy* przenosi lipidy, *hemoglobina* – tlen, a *transferyna* – żelazo. Wiele białek zanurzonych w błonach komórkowych transportuje jony lub małe cząsteczki w poprzek błony, m.in. białko bakteryjne *bakteriorodopsyna,* pompa aktywowana światłem – jony H^+ na zewnątrz komórki; *przenośnik glukozowy* – glukozę do i na zewnątrz komórek wątroby; *pompa* Ca^{2+} w komórkach mięśni – jony wapnia (niezbędne do wyzwolenia skurczu mięśnia) do retikulum endoplazmatycznego, gdzie są magazynowane

BIAŁKA MOTORYCZNE

funkcja: Generują ruch w komórkach i tkankach



przykłady: *Miozyna* w komórkach mięśni szkieletowych wytwarza siłę motoryczną, niezbędną do ruchu zwierząt; *kinezyna,* oddziałując z mikrotubulami, przemieszcza organelle w komórce; *dyneina* umożliwia ruch eukariotycznych rzęsek i wici

BIAŁKA ZAPASOWE

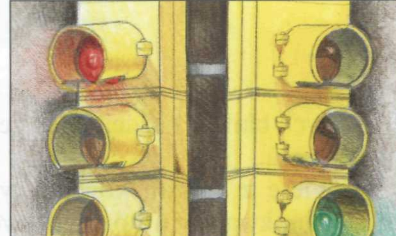
funkcja: Magazynują małe cząsteczki lub jony



przykłady: Żelazo jest magazynowane w wątrobie dzięki związaniu z niewielkim białkiem *ferrytyną; owoalbumina* w „białku" jaja stanowi źródło aminokwasów dla rozwijającego się zarodka ptaka; *kazeina* w mleku – dla młodych ssaków

BIAŁKA SYGNAŁOWE

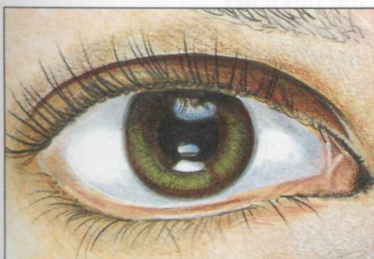
funkcja: Przenoszą sygnały z komórki do komórki



przykłady: Wiele hormonów i czynników wzrostu koordynujących fizjologiczne funkcje u zwierząt jest białkami, m.in. małe białko *insulina* kontroluje poziom glukozy we krwi; *netryna* przyciąga rosnące komórki nerwowe w odpowiednim kierunku w rozwijającym się zarodku; *czynnik wzrostu nerwu* (NGF) stymuluje wzrost aksonów niektórych typów komórek nerwowych; *czynnik wzrostu naskórka* (EGF) stymuluje wzrost i podziały komórek nabłonkowych

BIAŁKA RECEPTOROWE

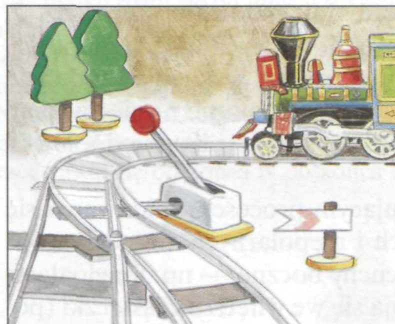
funkcja: Używane przez komórki do odbioru sygnałów i przekazywania ich do komórkowego aparatu generującego odpowiedź



przykłady: *Rodopsyna* w siatkówce wykrywa światło; *receptor acetylocholiny* w błonie komórek mięśni odbiera chemiczne sygnały uwalniane na zakończeniach nerwów; *receptor insuliny* umożliwia komórkom wątroby odpowiedź na hormon (insulinę) polegającą na pobraniu glukozy; *receptor adrenergiczny* w mięśniu sercowym wiążąc adrenalinę przyczynia się do przyspieszenia pracy serca

BIAŁKA REGULUJĄCE GENY

funkcja: Wiążą się z DNA, co prowadzi do włączenia lub wyłączenia genów



przykłady: *Represor operonu laktozowego* u bakterii wyłącza ekspresję genów, które kodują enzymy degradujące cukier laktozę; wiele różnych *białek homeodomenowych* działa jako genetyczne przełączniki kontrolujące rozwój organizmów wielokomórkowych, w tym człowieka

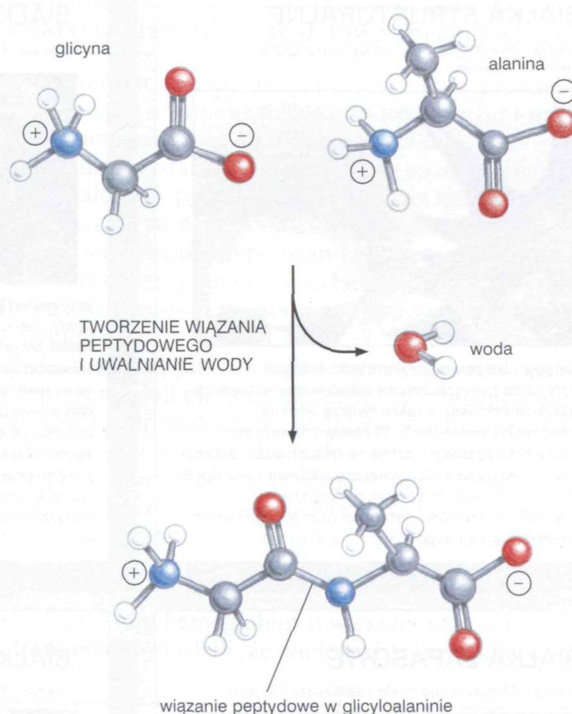
BIAŁKA SPECJALNEGO PRZEZNACZENIA

funkcja: Bardzo różnorodna



przykłady: Organizmy wytwarzają wiele bardzo wyspecjalizowanych białek o zdumiewającej różnorodności funkcji. *Białko zapobiegające zamarzaniu*, występujące u ryb obszaru Arktyki i Antarktydy, chroni ich krew przed zamarznięciem; *białko zielonej fluorescencji* u meduzy emituje zielone światło; *monelina,* białko występujące u pewnej afrykańskiej rośliny, ma intensywnie słodki smak; małże i inne morskie organizmy wydzielają *klejące białka*, którymi przyczepiają się mocno do skał, nawet zanurzonych w wodzie morskiej

Panel 5-1. Przykłady funkcji białek



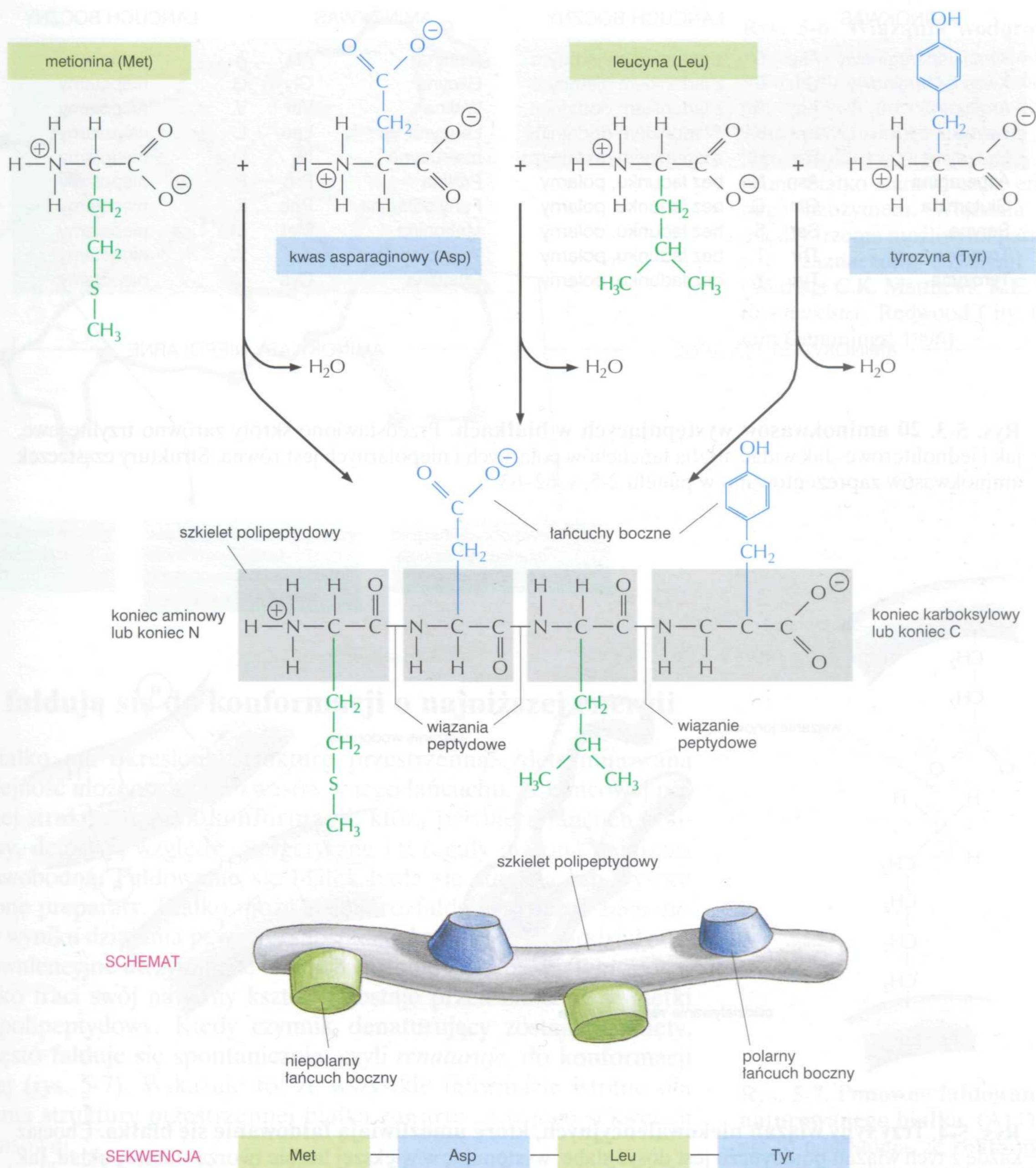
Rys. 5-1. Wiązanie peptydowe. Takie wiązanie kowalencyjne powstaje, gdy atom węgla grupy karboksylowej jednego aminokwasu uwspólnia elektrony z atomem azotu (*niebieski*) grupy aminowej drugiego aminokwasu. Jak pokazano na rysunku, w tej reakcji kondensacji uwalnia się cząsteczka wody

różnych białek, każde z nich ze swą własną, określoną sekwencją aminokwasową.

Wiele z wiązań kowalencyjnych w długim łańcuchu zbudowanym z aminokwasów umożliwia swobodną rotację atomów połączonych tymi wiązaniami, dzięki czemu łańcuch polipeptydowy może w zasadzie zwijać się na olbrzymią ilość sposobów. Każdy zwinięty łańcuch jest skrępowany wieloma różnymi słabymi *wiązaniami niekowalencyjnymi*, które powstają z udziałem atomów ze szkieletu polipeptydowego i bocznych łańcuchów aminokwasów. Jak przedstawiono w rozdz. 2 (panel 2-7, s. 70–71), tymi słabymi wiązaniami są *wiązania wodorowe*, *wiązania jonowe* i *oddziaływania van der Waalsa*. W porównaniu z wiązaniami kowalencyjnymi, wiązania niekowalencyjne są słabe, dlatego też utrzymanie razem dwóch fragmentów łańcucha polipeptydowego wymaga wielu wiązań niekowalencyjnych. Łączna siła dużej liczby takich wiązań będzie więc wpływać na stabilność każdej zwiniętej struktury przestrzennej (rys. 5-4).

W tworzeniu struktury przestrzennej białka kluczową rolę odgrywa jeszcze jeden rodzaj słabych oddziaływań. Jak omówiono w rozdz. 2, w obecności wody cząsteczki hydrofobowe, do których należą niepolarne łańcuchy boczne poszczególnych aminokwasów, wykazują tendencję do skupiania się, co minimalizuje ich niszczące działanie na sieć wiązań wodorowych między cząsteczkami wody (patrz s. 48. i panel 2-2, s. 50–51).

Dlatego też ważnym czynnikiem sterującym procesem fałdowania się białka jest rozmieszczenie jego polarnych i niepolarnych aminokwasów. W białku niepolarne (hydrofobowe) łańcuchy boczne — np. fenyloalaniny, leucyny, waliny i tryptofanu — skupiają się we wnętrzu cząsteczki (podobnie jak kropelki tłuszczu, które łącząc się tworzą jedną dużą kroplę). Umożliwia to im unikanie kontaktu z wodą, otaczającą je we wnętrzu komórki. Natomiast polarne łańcuchy boczne — np. argininy, glutaminy i histydyny — ustawiają się w pobliżu powierzchni cząsteczki, gdzie mogą

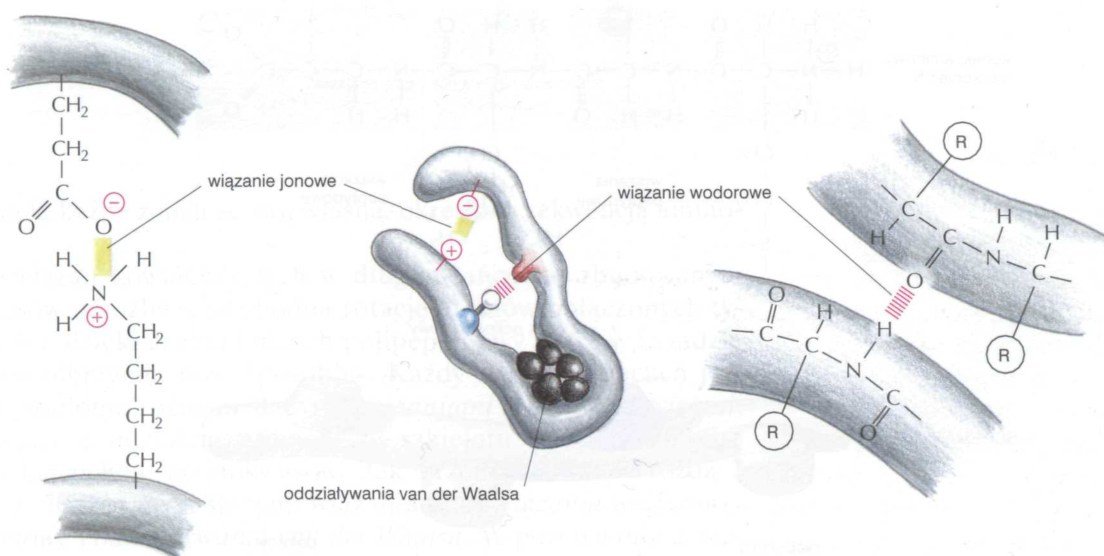


Rys. 5-2. Białka składają się ze szkieletu polipeptydowego z przyłączonymi łańcuchami bocznymi. Każde białko różni się od innych sekwencją i liczbą aminokwasów, dlatego też sekwencja chemicznie zróżnicowanych łańcuchów bocznych jest czynnikiem decydującym o odmienności każdego białka. Końce łańcucha polipeptydowego są chemicznie niejednakowe: koniec z wolną grupą aminową (NH_3^+, zapisywaną również jako NH_2) nazwano końcem N lub aminowym, a koniec z wolną grupą karboksylową (COO^-, zapisywaną także w postaci COOH) nazwano końcem C lub karboksylowym. Sekwencję aminokwasową białka przedstawia się od końca N do końca C, czytając od lewej strony do prawej

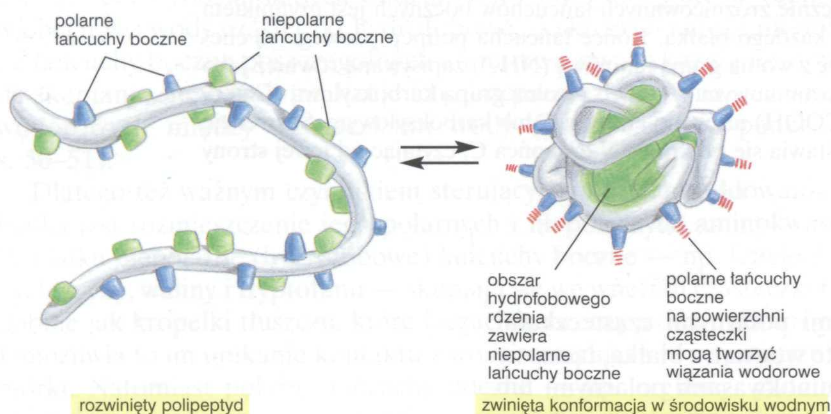
tworzyć wiązania wodorowe z wodą i innymi polarnymi cząsteczkami (rys. 5-5). Kiedy aminokwasy polarne są ukryte wewnątrz białka, łączą się zwykle wiązaniami wodorowymi z innymi aminokwasami polarnymi lub ze szkieletem polipeptydowym (rys. 5-6).

AMINOKWAS			ŁAŃCUCH BOCZNY	AMINOKWAS			ŁAŃCUCH BOCZNY
Kwas asparaginowy	Asp	D	z ładunkiem ujemnym	Alanina	Ala	A	niepolarny
Kwas glutaminowy	Glu	E	z ładunkiem ujemnym	Glicyna	Gly	G	niepolarny
Arginina	Arg	R	z ładunkiem dodatnim	Walina	Val	V	niepolarny
Lizyna	Lys	K	z ładunkiem dodatnim	Leucyna	Leu	L	niepolarny
Histydyna	His	H	z ładunkiem dodatnim	Izoleucyna	Ile	I	niepolarny
Asparagina	Asn	N	bez ładunku, polarny	Prolina	Pro	P	niepolarny
Glutamina	Gln	Q	bez ładunku, polarny	Fenyloalanina	Phe	F	niepolarny
Seryna	Ser	S	bez ładunku, polarny	Metionina	Met	M	niepolarny
Treonina	Thr	T	bez ładunku, polarny	Tryptofan	Trp	W	niepolarny
Tyrozyna	Tyr	Y	bez ładunku, polarny	Cysteina	Cys	C	niepolarny
AMINOKWASY POLARNE				AMINOKWASY NIEPOLARNE			

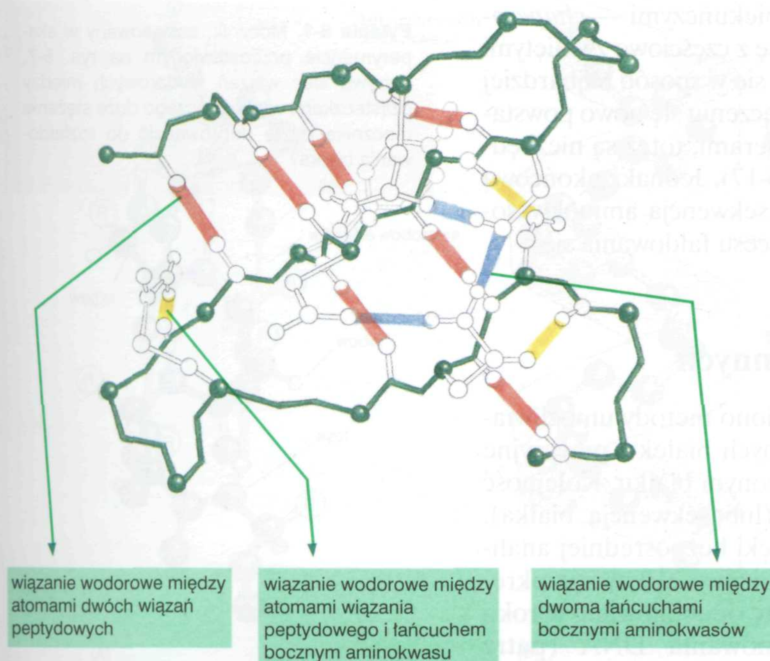
Rys. 5-3. 20 aminokwasów występujących w białkach. Przedstawiono skróty zarówno trzyliterowe, jak i jednoliterowe. Jak widać, liczba łańcuchów polarnych i niepolarnych jest równa. Struktury cząsteczek aminokwasów zaprezentowano w panelu 2-5, s. 62–63



Rys. 5-4. Trzy typy wiązań niekowalencyjnych, które umożliwiają fałdowanie się białka. Chociaż każde z tych wiązań pojedynczo jest dosyć słabe, występując w większej liczbie tworzą stabilny układ, tak jak w przedstawionym przykładzie. R — łańcuch boczny



Rys. 5-5. Fałdowanie się białka w zwartą konformację. Łańcuchy boczne aminokwasów polarnych wykazują tendencję do gromadzenia się na powierzchni białka, gdzie mogą oddziaływać z wodą; łańcuchy boczne aminokwasów niepolarnych zanurzone są we wnętrzu cząsteczki, gdzie tworzą ściśle upakowany hydrofobowy rdzeń atomów ukrytych przed wodą. Białko przedstawione na tym bardzo schematycznym rysunku zawiera tylko ok. 30 aminokwasów



Rys. 5-6. Wiązania wodorowe w cząsteczce białka. Między sąsiadującymi ze sobą rejonami zwiniętego łańcucha polipeptydowego powstaje duża liczba wiązań wodorowych, które ułatwiają stabilizację jego struktury przestrzennej. Przedstawione białko stanowi część enzymu zwanego lizozymem. Wiązania wodorowe między trzema możliwymi parami partnerów zaznaczono różnymi kolorami. (Według: C.K. Matthews, K.E. van Holde, *Biochemistry*. Redwood City, CA: Benjamin/Cummings, 1996)

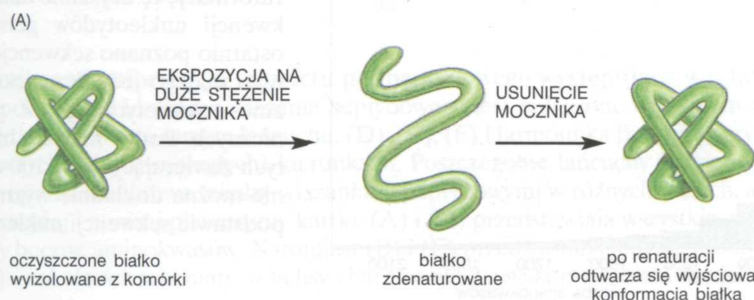
Białka fałdują się do konformacji o najniższej energii

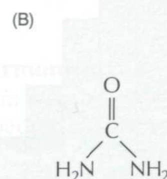
Każde białko ma określoną strukturę przestrzenną, zdeterminowaną przez kolejność ułożenia aminokwasów w jego łańcuchu. O końcowej pofałdowanej strukturze, czyli **konformacji**, którą przybiera łańcuch polipeptydowy, decydują względy energetyczne i z reguły ma ona najniższą energię swobodną. Fałdowanie się białek bada się stosując ich wysoce oczyszczone preparaty. Białko może zostać rozfałdowane, czyli *zdenaturowane* w wyniku działania pewnych substancji, które zrywają oddziaływania niekowalencyjne utrzymujące łańcuch w stanie zwiniętym. Tym sposobem białko traci swój natywny kształt i zostaje przekształcone w giętki łańcuch polipeptydowy. Kiedy czynnik denaturujący zostaje usunięty, białko często fałduje się spontanicznie, czyli *renaturuje*, do konformacji wyjściowej (rys. 5-7). Wskazuje to, że wszystkie informacje istotne dla wytworzenia struktury przestrzennej białka zawarte są w jego sekwencji aminokwasowej.

Każde białko fałduje się do określonej stabilnej konformacji. Jednakże w komórce konformacja ta ulega często subtelnej zmianie podczas oddziaływania białka z innymi cząsteczkami. Jak zobaczymy później w tym rozdziale, zmiana ta jest często krytyczna dla funkcji białka.

Chociaż łańcuch białkowy może zwinąć się w prawidłową konformację bez pomocy z zewnątrz, w fałdowaniu się białek w komórkach uczestniczą

Rys. 5-7. Ponowne fałdowanie się zdenaturowanego białka. (A) Doświadczenie to udawadnia, że konformacja białka jest determinowana wyłącznie przez jego sekwencję aminokwasową. (B) Struktura mocznika, który jest bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie i rozfałdowuje białka będąc w dużym stężeniu, kiedy mniej więcej jedna cząsteczka mocznika przypada na sześć cząsteczek wody





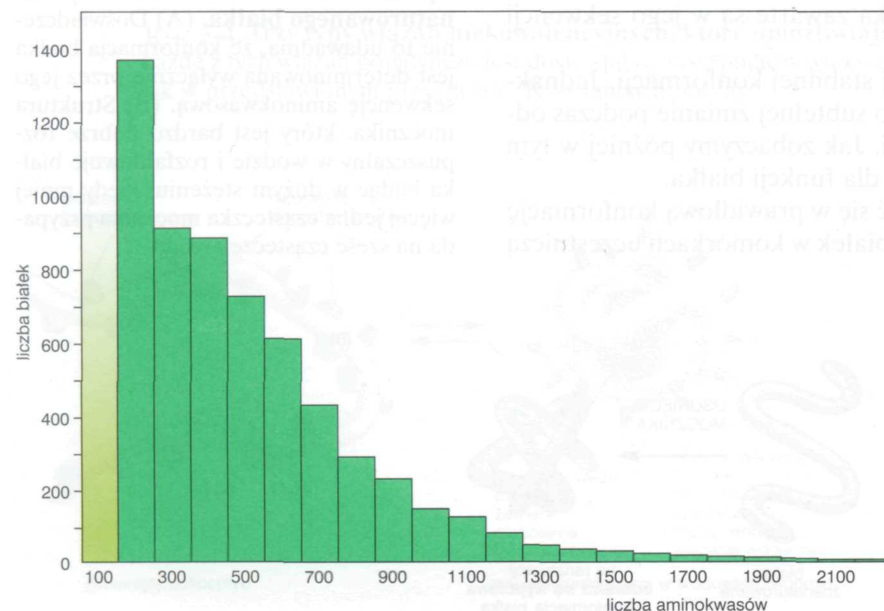
zazwyczaj specjalne białka nazywane białkami opiekuńczymi — *chaperonami* (z ang., czyt. czaperonami). Białka te wiążą się z częściowo zwiniętymi łańcuchami i umożliwiają im kontynuację zwijania się w sposób najbardziej korzystny energetycznie. Chaperony zapobiegają łączeniu się nowo powstałych łańcuchów białkowych z niewłaściwymi partnerami, toteż są niezbędne w tłoku panującym w cytoplazmie (patrz rys. 3-17). Jednakże końcową strukturę przestrzenną białka nadal określa jego sekwencja aminokwasowa: chaperony jedynie zwiększają skuteczność procesu fałdowania się.

Pytanie 5-1. Mocznik, zastosowany w eksperymencie przedstawionym na rys. 5-7, rozrywa sieć wiązań wodorowych między cząsteczkami wody. Dlaczego duże stężenie mocznika może doprowadzić do rozfałdowania białka?

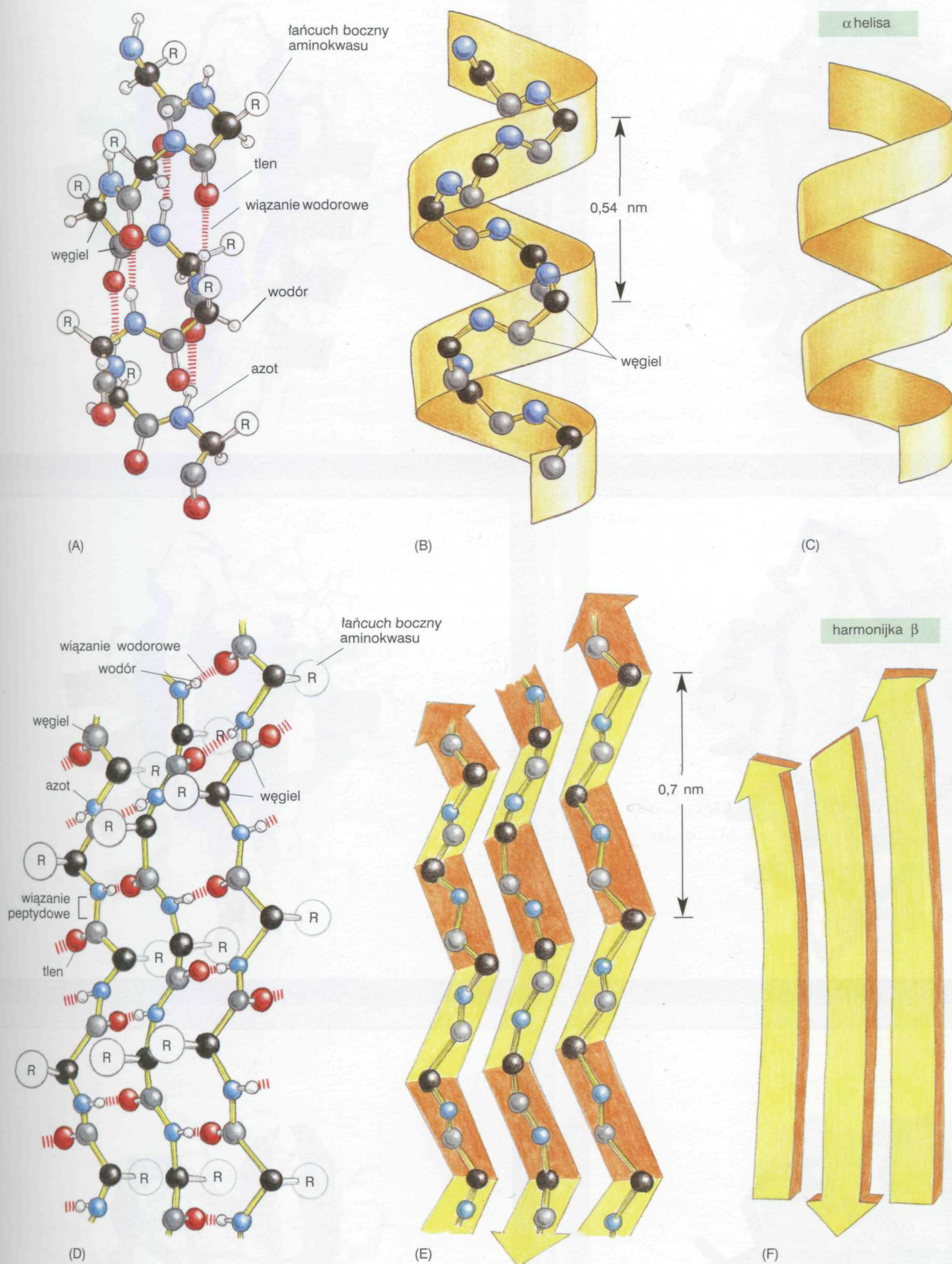
Białka osiągają wielką różnorodność skomplikowanych struktur przestrzennych

W panelach 5-4, 5-5 i 5-6 (s. 160–165) przedstawiono metody umożliwiające rozbicie komórek, oczyszczanie poszczególnych białek i precyzyjne wyznaczanie kolejności aminokwasów w oczyszczonym białku. Kolejność ta nazywana jest **sekwencją aminokwasową** (lub sekwencją białka). Przez wiele lat sekwencje białek wyznaczano dzięki bezpośredniej analizie tworzących je aminokwasów. Pierwszym białkiem o całkowicie określonej sekwencji był hormon *insulina*; sekwencję tę opublikowano w roku 1955. Ustalenie szybkich metod sekwencjonowania DNA (patrz rozdz. 10) znacznie ułatwiło sekwencjonowanie białek w sposób pośredni, tj. poprzez wyznaczanie kolejności nukleotydów w DNA kodującym dane białko i przedstawienie jej w postaci sekwencji aminokwasów dzięki zastosowaniu kodu genetycznego (patrz rozdz. 7). W ten sposób poznano już sekwencję aminokwasową dziesiątków tysięcy białek. Białka zawierają od 30 do ponad 10 000 aminokwasów, ale w większości białek liczba aminokwasów waha się w granicach od 50 do 2000 (rys. 5-8).

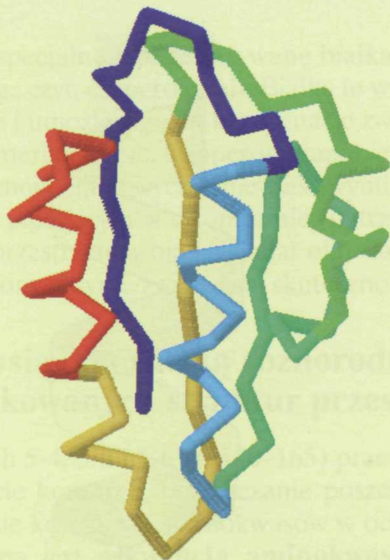
Wszystkie informacje niezbędne do zwinięcia się łańcucha polipeptydowego zawarte są w jego sekwencji aminokwasowej. Jednakże jeszcze nie wiemy jak „odczytywać" tę informację, aby na podstawie sekwencji aminokwasowej ustalić szczegółową strukturę przestrzenną białka — to jest przestrzenne ułożenie wszystkich jego atomów. Obecnie sposób pofałdowania białka można określić dokładnie jedynie eksperymentalnie, stosując krystalografię rentgenowską lub jądrowy rezonans magnetyczny. Techniki te opisano w panelu 5-6 (s. 164–165). Do tej pory umożliwiły one



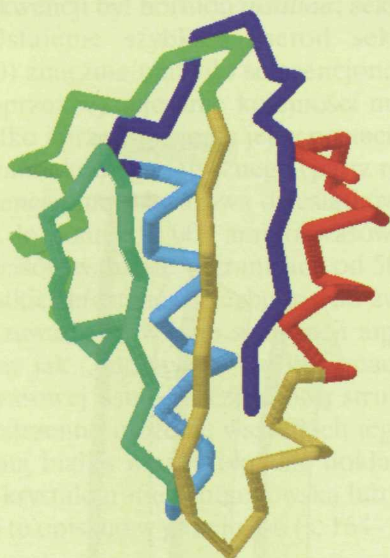
Rys. 5-8. Wielkość białek. Białka występujące w komórce bardzo różnią się wielkością. Typowa komórka bakterii zawiera około tysiąca różnych białek, natomiast w komórce człowieka liczbę tę szacuje się na około 10 000. Na rysunku przedstawiono histogram białek kodowanych przez kilka chromosomów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, uwzględniający liczby przewidywanych białek danej wielkości. Informację tę uzyskano dzięki analizie sekwencji nukleotydów genomu drożdży; ostatnio poznano sekwencję całego DNA tego małego jednokomórkowego organizmu eukariotycznego. Z przyczyn technicznych liczby małych białek, głównie tych zawierających do 100 aminokwasów, nie można dokładnie wyznaczyć tylko na podstawie sekwencji nukleotydów



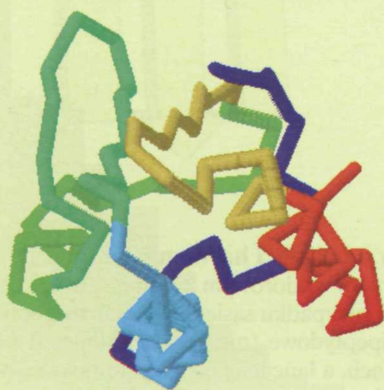
Rys. 5-9. Regularna konformacja szkieletu polipeptydowego występująca w α helisie i harmonijce β. (A), (B), (C) α Helisa, w której ugrupowanie NH każdego wiązania peptydowego jest połączone wiązaniem wodorowym z grupą C=O czwartego z kolei wiązania peptydowego w tym samym łańcuchu. (D), (E), (F) Harmonijka β; w tym przypadku sąsiednie łańcuchy peptydowe przebiegają w przeciwnych (antyrównoległych) kierunkach. Poszczególne łańcuchy polipeptydowe (nici) w harmonijce β są utrzymywane razem przez wiązania wodorowe między wiązaniami peptydowymi w różnych niciach, a łańcuchy boczne aminokwasów w każdej nici znajdują się powyżej i poniżej płaszczyzny kartki. (A) i (D) przedstawiają wszystkie atomy w szkielecie polipeptydowym; R — pominięte łańcuchy boczne aminokwasów. Natomiast (B) i (E) przedstawiają jedynie atomy głównego łańcucha szkieletu polipeptydowego, a (C) i (F) — skrótowe schematy α helisy i harmonijki β z wykorzystaniem modelu wstęgowego białek (patrz panel 5-2B, s. 142)

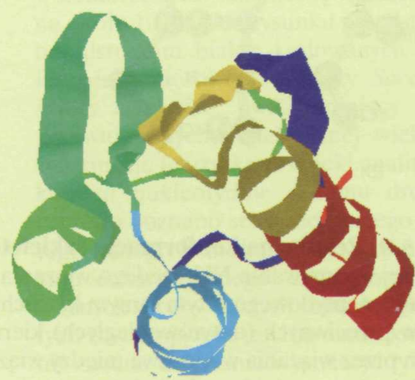








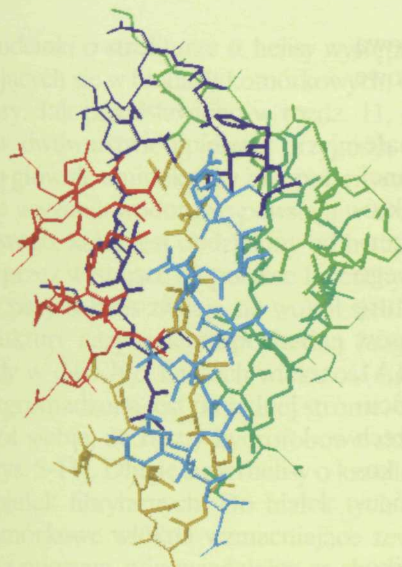


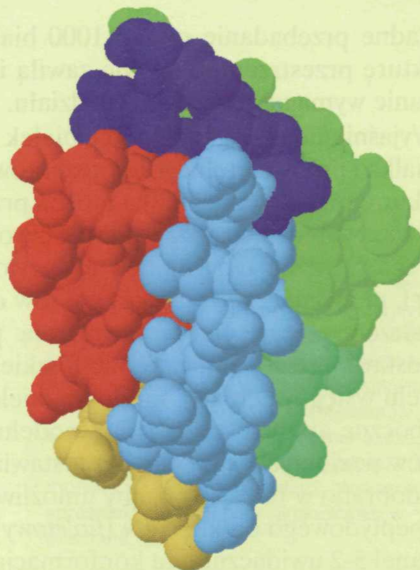


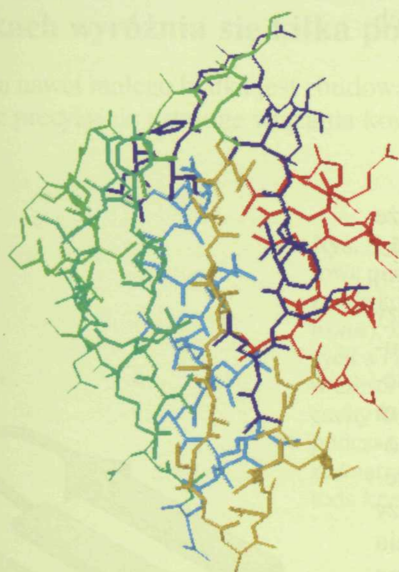
(A) Model szkieletowy łańcucha głównego

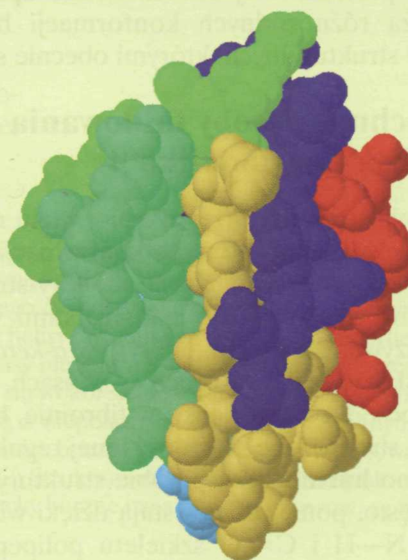
(B) Model wstęgowy

 Panel 5-2. Cztery różne sposoby przedstawiania małego białka. (Obrazy uzyskano stosując Ras Mol © Roger Sayle)



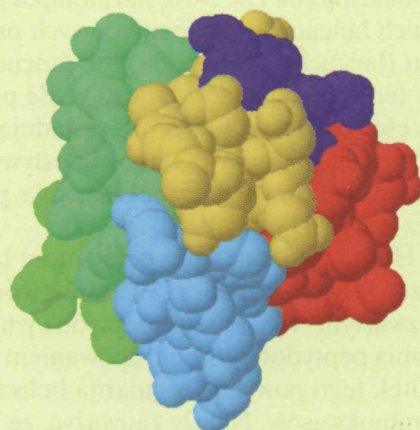








(C) Model szkieletowy z łańcuchami bocznymi



(D) Model czaszowy

dokładne przebadanie ponad 1000 białek. Każde z nich ma unikatową strukturę przestrzenną, na tyle zawiłą i nieregularną, że jej szczegółowe opisanie wymagałoby całego rozdziału.

Wyjaśnienie zasad konstrukcji białek rozpoczniemy od niezwykle małego białka i próby czytelnego zaprezentowania jego struktury przestrzennej. Strukturę przestrzenną białka można przedstawić na różne sposoby, z których każdy obrazuje różne jego właściwości. Panel 5-2 (s. 142–143) prezentuje cztery różne typy modeli fosforylowanego białka przenośnikowego (HPr), ułatwiającego transport cukrów do komórki bakteryjnej. Strukturę przestrzenną tego białka utworzoną przez łańcuch 88 aminokwasów przedstawiono za pomocą modelu szkieletowego łańcucha głównego (A), modelu wstęgowego (B), modelu szkieletowego uwzględniającego łańcuchy boczne aminokwasów (C) i modelu czaszowego (D). Każdy z trzech rzędów poziomych w panelu przedstawia białko w innym położeniu, a kolory dobrano w ten sposób, aby umożliwić prześledzenie przebiegu łańcucha peptydowego od końca N (*fioletowy*) do końca C (*czerwony*).

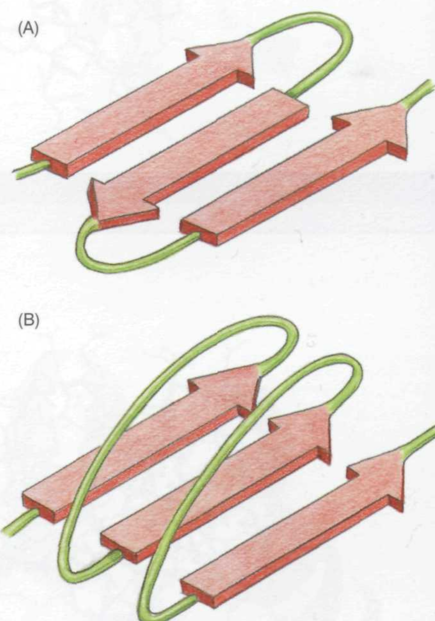
Panel 5-2 uwidacznia, że konformacja białka jest niezwykle skomplikowana, nawet w przypadku tak małego białka, jakim jest HPr. Ale opis struktury przestrzennej białek można uprościć, jeśli uwzględni się, iż u podłoża różnorodnych konformacji białek leży kilka wspólnych motywów strukturalnych, którymi obecnie się zajmiemy.

Powszechne sposoby fałdowania się białka to α helisa i harmonijka β

Porównanie struktury przestrzennej wielu różnych białek uwidacznia, że mimo całkowicie unikatowych konformacji całych cząsteczek, ich części zawierają często dwa regularne motywy strukturalne. Odkryto je ok. 50 lat temu w wyniku badań nad białkami włosów i jedwabiu. Pierwszy z nich, nazywany **α helisą**, odkryto w *α-keratynie*, białku obficie występującym w skórze i jej wytworach — włosach, paznokciach i rogach. W niecały rok po odkryciu α helisy, w fibroinie, będącej głównym składnikiem jedwabiu, stwierdzono obecność innej regularnie zwiniętej struktury, którą nazwano **harmonijką β**. Obie struktury występują w białkach szczególnie często, ponieważ powstają dzięki wiązaniom wodorowym między grupami N—H i C=O szkieletu polipeptydowego, bez angażowania łańcuchów bocznych aminokwasów; toteż mogą być tworzone przez różne sekwencje aminokwasowe. W każdym takim przypadku łańcuch białkowy przyjmuje regularną, powtarzającą się konformację. Obie struktury oraz sposoby ich oznaczania w modelu wstęgowym przedstawia rys. 5-9.

Rdzeń wielu białek zawiera rozległe obszary o strukturze harmonijki β. Jak pokazano na rys. 5-10, harmonijka β może powstawać z udziałem sąsiednich łańcuchów polipeptydowych przebiegających w tym samym kierunku (łańcuchy równoległe) lub łańcucha polipeptydowego, który zwija się w ten sposób, że każda jego część przebiega w kierunku przeciwnym do części bezpośrednio z nią sąsiadujących (łańcuchy antyrównoległe). Oba typy harmonijki β stanowią sztywną strukturę utrzymywaną przez wiązania wodorowe łączące wiązania peptydowe sąsiednich łańcuchów (patrz rys. 5-9D).

α Helisa powstaje, gdy pojedynczy łańcuch polipeptydowy skręca się tworząc sztywny cylinder. Wiązania wodorowe powstają między każdym co czwartym wiązaniem peptydowym, łącząc grupę C=O jednego wiązania peptydowego z ugrupowaniem N—H drugiego (patrz rys. 5-9A). Wskutek tego powstaje regularna helisa, na której pełen obrót przypada 3,6 aminokwasów. Należy zauważyć, że przykładowe białko przedstawione w panelu 5-2 zawiera zarówno α helisę, jak i harmonijkę β.



Rys. 5-10. Dwa typy struktury harmonijki β. (A) Antyrównoległa harmonijka β (patrz rys. 5-9D–F). (B) Równoległa harmonijka β. Obydwa typy są rozpowszechnione w białkach

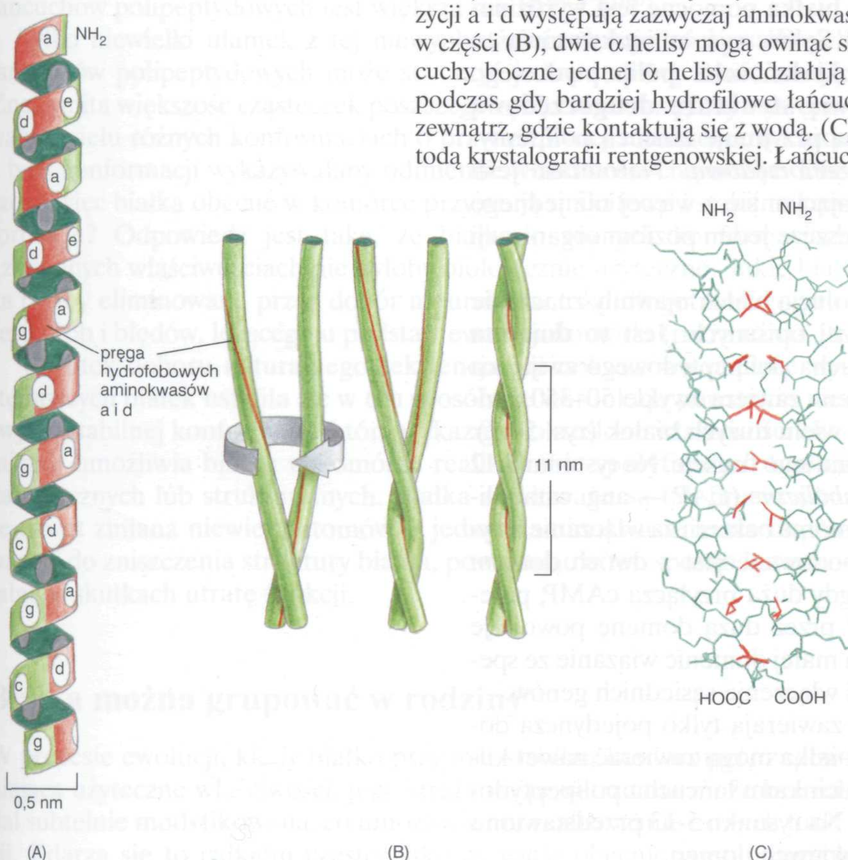
Krótkie odcinki o strukturze α helisy występują szczególnie często w białkach znajdujących się w błonach komórkowych, takich jak białka transportujące i receptory. Jak przedstawiono w rozdz. 11, części białka transbłonowego zanurzone w dwuwarstwie lipidowej przyjmują zazwyczaj strukturę α helisy, którą tworzą głównie aminokwasy z niepolarnymi łańcuchami bocznymi. W takiej α helisie wiązania wodorowe powstają w obrębie hydrofilowego szkieletu polipeptydowego, który jest oddzielony od hydrofobowego lipidowego środowiska błony przez wystające niepolarne łańcuchy boczne (patrz rys. 11-24).

Niekiedy pary α helis zwijają się wokół siebie, co prowadzi do powstania stabilnej struktury nazywanej **superhelisą** (ang. coiled coil). Struktura taka powstaje, gdy w dwóch α helisach większość niepolarnych (hydrofobowych) łańcuchów zgromadzona jest po jednej stronie, co umożliwia im takie skręcenie się wokół siebie, że reszty hydrofobowe skierowane zostają do wnętrza cząsteczki (rys. 5-11). Długie superhelisy o kształcie pręcika tworzą zrąb struktury wielu białek fibrylarnych. Do białek tych należy α-keratyna, budująca wewnątrzkomórkowe włókna wzmacniające zewnętrzną warstwę skóry i jej wyrostki oraz miozyna, odpowiedzialna za skurcz mięśni (patrz rozdz. 16).

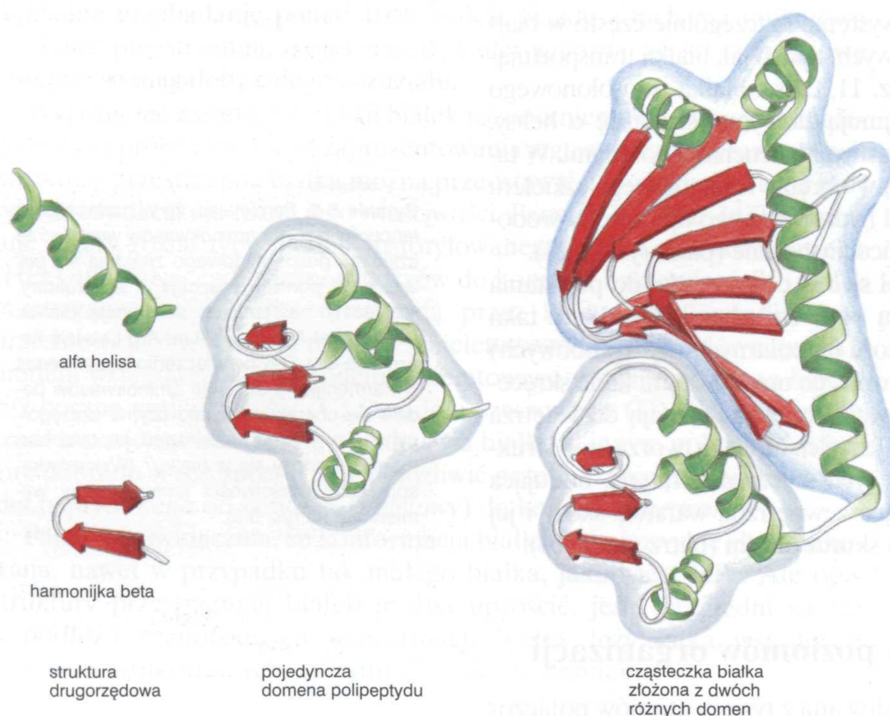
Pytanie 5-2. Pamiętając, że w harmonijce β łańcuchy boczne aminokwasów wystając ze szkieletu polipeptydowego znajdują się powyżej lub poniżej płaszczyzny tej struktury, rozważmy następującą sekwencję białka: Leu-Lys-Val-Asp-Ile-Ser-Leu-Arg-Leu-Lys-Ile-Arg-Phe-Glu. Czy po włączeniu tej sekwencji w harmonijkę β ułożenie aminokwasów będzie się charakteryzowało czymś szczególnym? Czy można przewidzieć, jak taka harmonijka β ułoży się w białku? (Wskazówka: sprawdzić właściwości aminokwasów wymienione na rys. 5-3).

W białkach wyróżnia się kilka poziomów organizacji

Cząsteczka nawet małego białka jest zbudowana z tysięcy atomów połączonych przez precyzyjnie ustalone wiązania kowalencyjne i niekowalencyjne.



Rys. 5-11. Struktura superhelisy. (A) Pojedyncza α helisa, zawierająca siedmioelementową powtarzającą się sekwencję oznaczoną abcdefg. W sekwencji tej aminokwasy a i d leżą blisko siebie na powierzchni powstałego cylindra, tworząc pręgę (*zaznaczoną na czerwono*), która łagodnie owija się wokół α helisy. W białkach tworzących superhelisę w pozycji a i d występują zazwyczaj aminokwasy niepolarne. Wskutek tego, jak przedstawiono w części (B), dwie α helisy mogą owinąć się wokół siebie w ten sposób, że niepolarne łańcuchy boczne jednej α helisy oddziałują z niepolarnymi łańcuchami bocznymi drugiej, podczas gdy bardziej hydrofilowe łańcuchy boczne aminokwasów eksponowane są na zewnątrz, gdzie kontaktują się z wodą. (C) Struktura atomowa superhelisy określona metodą krystalografii rentgenowskiej. Łańcuchy boczne oznaczone na *czerwono* są niepolarne



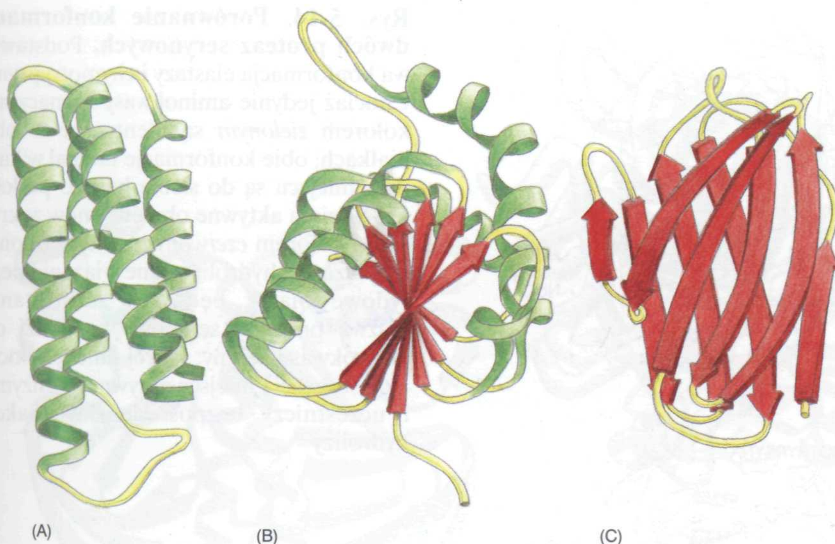
Rys. 5-12. Powiązania między domenami białka i innymi elementami strukturalnymi. Elementy struktury drugorzędowej, takie jak α helisa i harmonijka β upakowują się w stabilne elementy globularne, nazywane domenami. Cząsteczka typowego białka zbudowana jest z jednej lub więcej domen, często połączonych przez obszary łańcucha o stosunkowo niewielkim stopniu uporządkowania. Model wstęgowy po prawej przedstawia bakteryjne białko regulujące geny (CAP), złożone z dwóch domen: dużej (kolor *niebieski*) i małej (kolor *szary*)

Tak skomplikowaną strukturę jest niezwykle trudno wyobrazić sobie bez zastosowania specjalnych narzędzi. Z tej też przyczyny stosuje się różne pomoce graficzne i komputerowe. Obecnie dostępne są programy komputerowe umożliwiające stworzenie na ekranie komputera obrazu wybranych białek oraz jego przedstawienie i obracanie z zastosowaniem różnych formatów.

W rozważaniu struktury przestrzennej białka pomocne jest wyróżnienie różnych poziomów jego organizacji. Sekwencja aminokwasowa to *struktura pierwszorzędowa* białka. Odcinki łańcucha polipeptydowego tworzące α helisę i harmonijkę β stanowią **strukturę drugorzędową** białka. Trójwymiarową konformację, którą przyjmuje łańcuch polipeptydowy, nazywa się czasem *strukturą trzeciorzędową*. Natomiast jeśli cząsteczka białka jest kompleksem składającym się z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego, wyróżnia się jeszcze jeden poziom organizacji — *strukturę czwartorzędową*.

Badania nad konformacją, funkcją i ewolucją białek ujawniły znaczenie poziomu organizacji odmiennego od wyżej opisanych. Jest to **domena białka**, którą tworzy dowolna część łańcucha polipeptydowego zwijająca się w upakowaną stabilną strukturę. Domena zawiera zwykle 50–350 aminokwasów i stanowi moduł konstrukcyjny wielu dużych białek (rys. 5-12). Często różne domeny białka warunkują różne jego funkcje. Na rysunku 5-12 przedstawiono *białko aktywujące geny kataboliczne* (*CAP* — ang. catabolite activator protein), odpowiedzialne w komórce bakterii za włączanie i wyłączanie ekspresji genów. Białko CAP zbudowane jest z dwóch domen: mała domena wiąże się z DNA, podczas gdy duża przyłącza cAMP, przekaźnik drugiego rzędu. Związanie cAMP przez dużą domenę powoduje zmianę w konformacji białka, co umożliwia małej domenie wiązanie ze specyficzną sekwencją DNA i w konsekwencji włączenie sąsiednich genów.

Małe cząsteczki białka, takie jak HPr, zawierają tylko pojedynczą domenę (patrz panel 5-2, s. 142–143) Duże białka mogą zawierać nawet kilka tuzinów domen, połączonych zwykle odcinkami łańcucha polipeptydowego o stosunkowo słabej strukturalizacji. Na rysunku 5-13 przedstawiono modele wstęgowe trzech różnie zorganizowanych domen.



Rys. 5-13. Modele wstęgowe domen trzech różnych białek. (A) Cytochrom b_{562}, białko o jednej domenie uczestniczące w transporcie elektronów w mitochondriach. Białko to zbudowane jest prawie wyłącznie z α helisy. (B) Wiążąca NAD domena enzymu dehydrogenazy mleczanowej, zbudowana z mieszaniny α helis i harmonijek β. (C) Region zmienny łańcucha lekkiego immunoglobuliny (przeciwciała), złożony z dwóch harmonijek β tworzących strukturę sandwicza. W przedstawionych przykładach α helisę zaznaczono kolorem *zielonym*, natomiast nici harmonijki β zaznaczono jako *czerwone* strzałki. Należy zauważyć, że łańcuch polipeptydowy z reguły przechodzi tam i z powrotem przez całą domenę, skręcając ostro jedynie na powierzchni białka. Wystające *regiony w postaci pętli* (kolor *żółty*) tworzą często miejsca wiążące inne cząsteczki. (Dzięki uprzejmości: Jane Richardson)

Tylko nieliczne z wielu możliwych łańcuchów polipeptydowych są użyteczne

Liczba różnych łańcuchów polipeptydowych, które mogą powstać, jest teoretycznie ogromna. Ponieważ każdy z aminokwasów jest cząsteczką odrębną chemicznie i każdy z nich może zająć dowolną pozycję w białku, istnieje $20 \cdot 20 \cdot 20 \cdot 20 = 160\,000$ różnych możliwych łańcuchów polipeptydowych zbudowanych z czterech aminokwasów lub 20^n łańcuchów polipeptydowych zbudowanych z n aminokwasów. Dla typowego białka zbudowanego z około 300 aminokwasów liczba możliwych teoretycznie łańcuchów polipeptydowych jest większa niż 10^{390} (20^{300}).

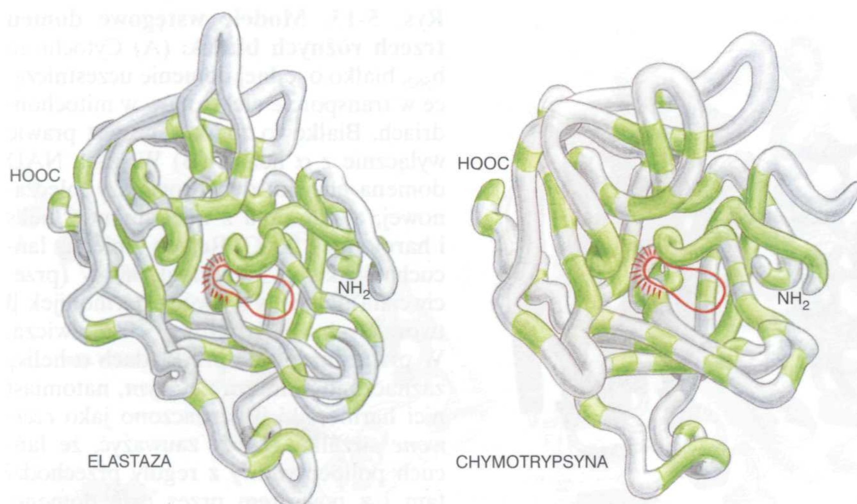
Tylko niewielki ułamek z tej niewyobrażalnie dużej ilości możliwych łańcuchów polipeptydowych może stworzyć jedną stabilną konformację. Znakomita większość cząsteczek poszczególnych białek mogłaby występować w wielu różnych konformacjach o prawie równej stabilności, a każda z tych konformacji wykazywałaby odmienne właściwości chemiczne. Dlaczego więc białka obecne w komórce przyjmują unikatowe i stabilne konformacje? Odpowiedź jest taka, że białko o różnych konformacjach i zmiennych właściwościach nie byłoby biologicznie użyteczne. Takie białka byłyby eliminowane przez dobór naturalny w toku długotrwałego procesu prób i błędów, leżącego u podstaw ewolucji komórki (patrz rozdz. 9).

Wskutek doboru naturalnego sekwencja aminokwasowa obecnie występujących białek ustaliła się w ten sposób, że warunkuje powstanie niezwykle stabilnej konformacji, która wykazując określone właściwości chemiczne umożliwia białku w komórce realizowanie specyficznych funkcji katalitycznych lub strukturalnych. Białka zbudowane są tak precyzyjnie, że nawet zmiana niewielu atomów w jednym aminokwasie może doprowadzić do zniszczenia struktury białka, powodując w ten sposób katastrofalną w skutkach utratę funkcji.

Pytanie 5-3. Przypadkowe mutacje białka bardzo rzadko prowadzą do zmian poprawiających jego przydatność dla komórki, a jednak mutacje użyteczne ulegają pozytywnej selekcji. Ponieważ zmiany te są tak rzadkie, na każdą użyteczną mutację przypadają niezliczone mutacje prowadzące do braku zmian właściwości białka lub jego inaktywacji. Dlaczego zatem komórki nie zawierają milionów różnych bezużytecznych białek?

Białka można grupować w rodziny

W procesie ewolucji, kiedy białko przyjmie stabilną konformację zapewniającą użyteczne właściwości, jego struktura przestrzenna może być nadal subtelnie modyfikowana, co umożliwia mu realizowanie nowych funkcji. Zdarza się to całkiem często, jako że wiele obecnie występujących



Rys. 5-14. Porównanie konformacji dwóch proteaz serynowych. Podstawowa konformacja elastazy i chymotrypsyny. Chociaż jedynie aminokwasy zaznaczone kolorem *zielonym* są identyczne w obu białkach, obie konformacje niemal w każdym miejscu są do siebie bardzo podobne. Miejsca aktywne obu enzymów zakreślono kolorem *czerwonym*; w tym rejonie są wiązane i hydrolizowane wiązania peptydowe białek będących substratami. Nazwa proteazy serynowe pochodzi od aminokwasu seryny, której łańcuch boczny jest częścią miejsca aktywnego enzymu i uczestniczy bezpośrednio w reakcji hydrolizy

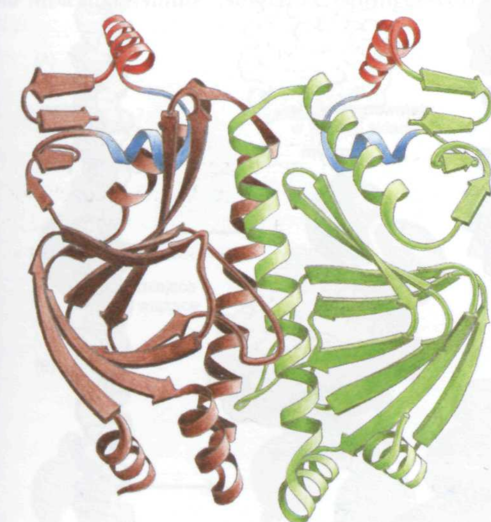
białek można pogrupować w **rodziny białek**. Białka zaliczane do jednej rodziny są do siebie bardzo podobne pod względem sekwencji aminokwasowej i struktury przestrzennej.

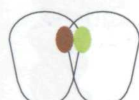
Rozważmy na przykład *proteazy serynowe*, rodzinę enzymów hydrolizujących białka, obejmującą enzymy trawienne — chymotrypsynę, trypsynę i elastazę — oraz niektóre proteazy uczestniczące w procesie krzepnięcia krwi. Porównanie dowolnych dwóch enzymów z tej rodziny wskazuje na obecność odcinków o niemal identycznej sekwencji aminokwasowej. Podobieństwo ich struktury przestrzennej jest nawet bardziej uderzające: większość szczegółowych skrętów i zwrotów ich łańcuchów polipeptydowych, zawierających kilkaset aminokwasów, jest w istocie identyczna (rys. 5-14). Niemniej każda z proteaz serynowych wykazuje odmienną aktywność enzymatyczną, każda hydrolizuje inne białka lub wiązania peptydowe między różnymi typami aminokwasów. Każda z nich pełni więc w organizmie inną funkcję.

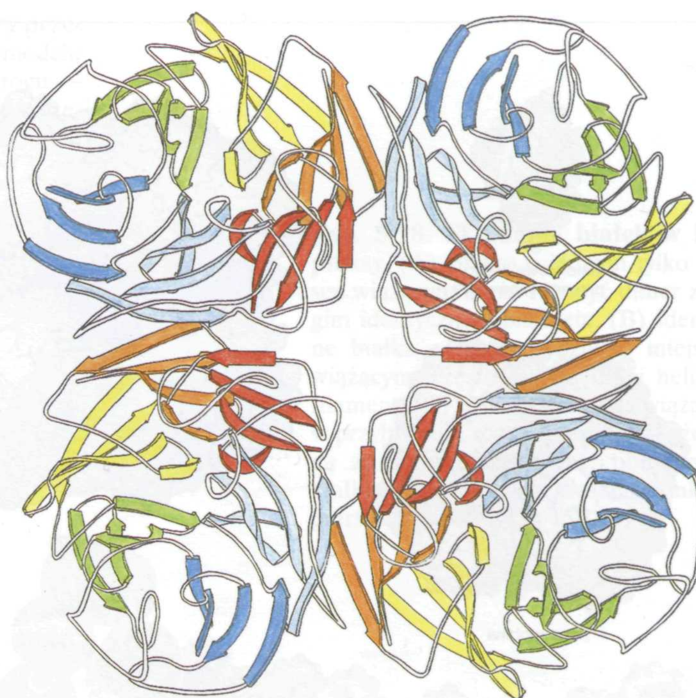
Cząsteczki większych białek zawierają często więcej niż jeden łańcuch polipeptydowy

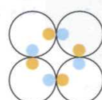
Te same słabe wiązania niekowalencyjne, które umożliwiają białku fałdowanie się do specyficznej konformacji, pozwalają również białkom wiązać się ze sobą, co prowadzi do powstania w komórce większych struktur. Każdy obszar na powierzchni białka, który oddziałuje z inną cząsteczką dzięki serii wiązań niekowalencyjnych, nazywa się miejscem wiążącym. Białko może zawierać miejsca wiążące dla różnych cząsteczek, wielkich i małych. Jeśli miejsce wiążące rozpoznaje powierzchnię drugiego białka, zachodzące w tym miejscu ścisłe związanie dwóch zwiniętych łańcuchów polipeptydowych może doprowadzić do powstania większej cząsteczki białka z precyzyjnie określoną geometrią. Każdy łańcuch polipeptydowy w takim białku nazywany jest **podjednostką**.

W najprostszym przypadku, dwa identycznie zwinięte łańcuchy polipeptydowe zwiążą się ze sobą w ustawieniu „głowa do głowy", tworząc symetryczny kompleks dwóch białkowych podjednostek (nazywany *dimerem*), który utrzymywany jest w całości dzięki oddziaływaniom między dwoma identycznymi miejscami wiążącymi. Omówione wcześniej białko CAP jest w istocie w komórce bakterii dimerem (rys. 5-15A), tworzonym przez dwie identyczne kopie podjednostki białkowej przedstawionej na rys. 5-12. W komórkach występuje powszechnie wiele innych symetrycznych









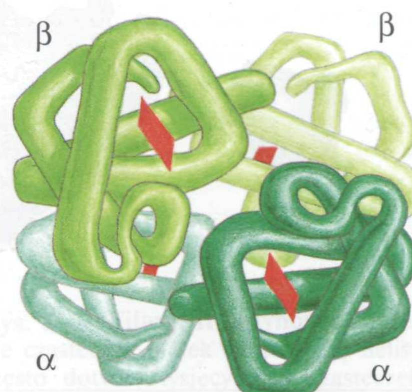
Rys. 5-15. Cząsteczki wielu białek zawierają wielokrotne kopie jednakowych podjednostek. (A) Symetryczny dimer. Białko CAP jest kompleksem dwóch identycznych łańcuchów polipeptydowych (por. rys. 5-12). (B) Symetryczny tetramer. Enzym neuraminidaza zbudowany jest z czterech identycznych łańcuchów polipeptydowych, ustawionych w postaci pierścienia. Małe schematyczne rysunki zamieszczone w części (A) i (B) prezentują tworzenie się struktury w wyniku powtarzającego się użycia tych samych wiążących oddziaływań

kompleksów białkowych, tworzonych z wielokrotnych kopii pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Enzym *neuraminidaza*, na przykład, składa się z pierścienia czterech identycznych podjednostek białkowych (rys. 5-15B).

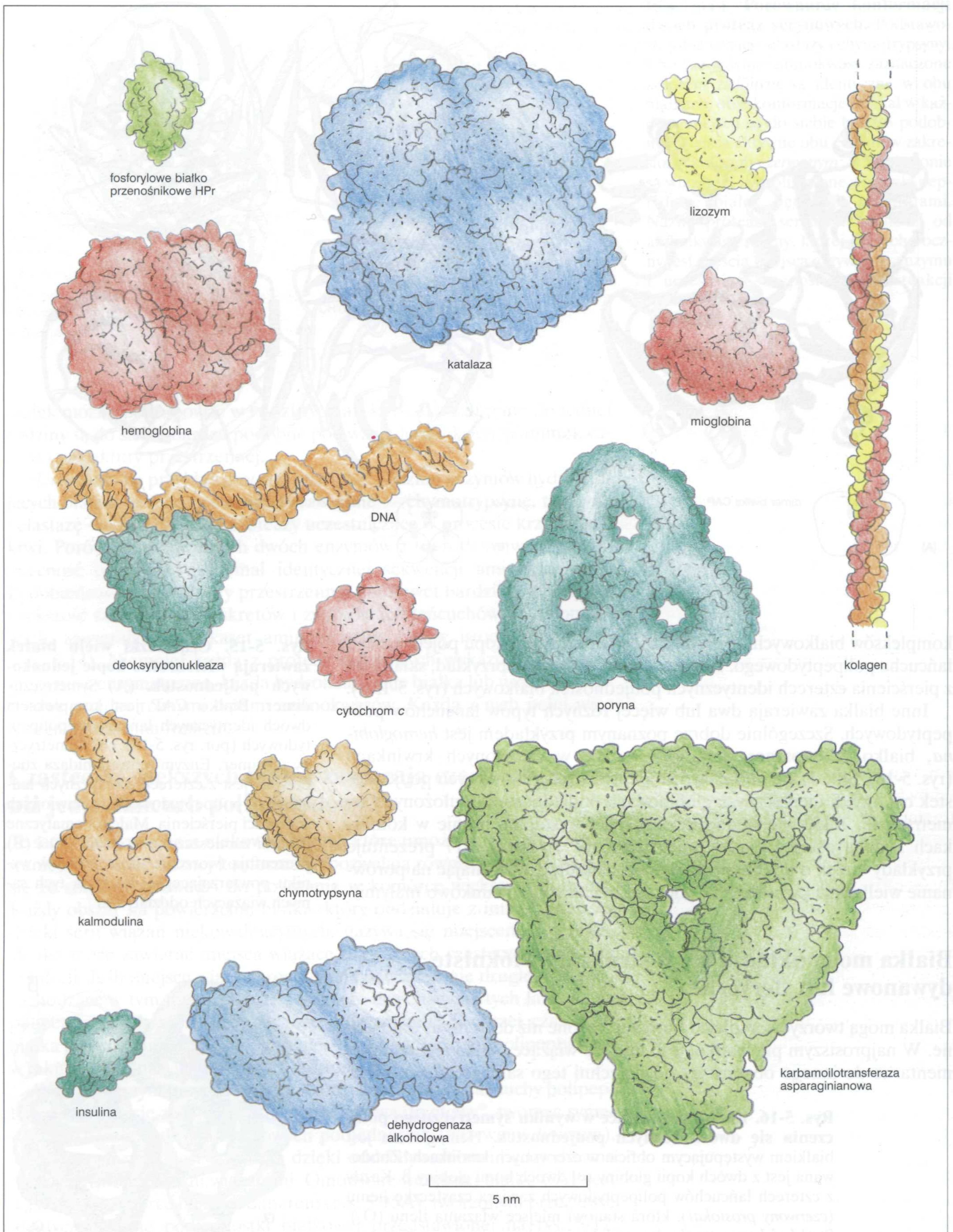
Inne białka zawierają dwa lub więcej różnych typów łańcuchów polipeptydowych. Szczególnie dobrze poznanym przykładem jest *hemoglobina*, białko przenoszące tlen, występujace w czerwonych krwinkach (rys. 5-16). Składa się ono z dwóch identycznych globinowych podjednostek α i dwóch identycznych globinowych podjednostek β, ułożonych symetrycznie. Takie wielojednostkowe białka występują licznie w komórkach i mogą osiagać bardzo duże rozmiary. Rysunek 5-17 prezentuje przykłady białek o dokładnie poznanej strukturze, pozwalając na porównanie wielkości i kształtu kilku większych białek ze stosunkowo małymi.

Białka mogą układać się w struktury włókniste, dywanowe lub sferyczne

Białka mogą tworzyć kompleksy bardziej złożone niż dotychczas omówione. W najprostszym przypadku, jeśli miejsce wiążące białka jest komplementarne do innego obszaru na powierzchni tego samego białka, może

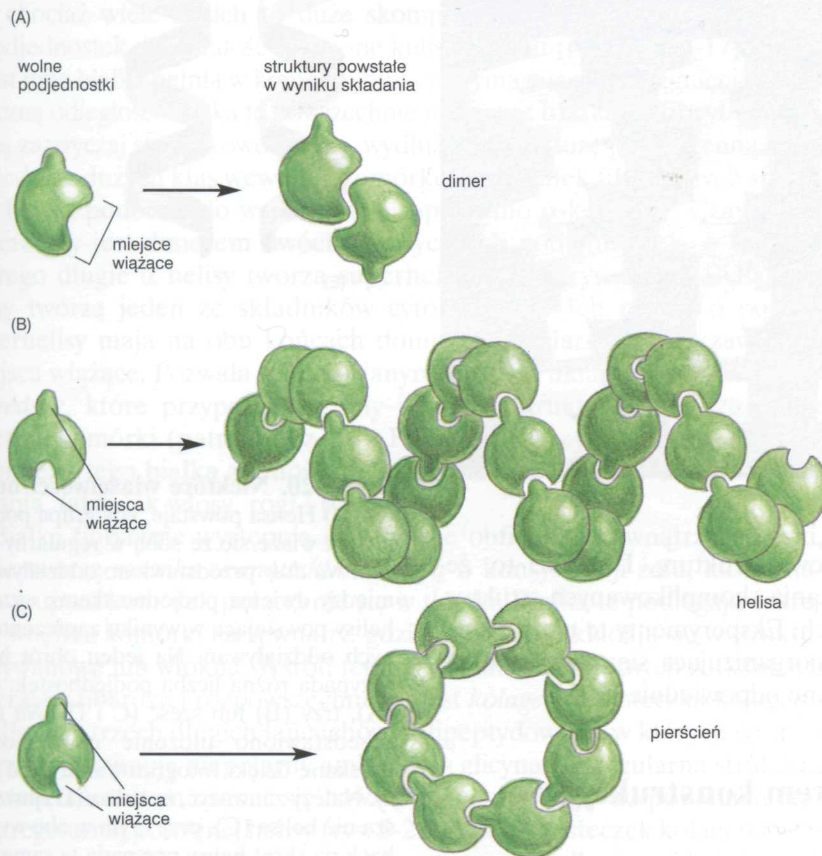


Rys. 5-16. Białko powstające w wyniku symetrycznego połączenia się dwóch różnych podjednostek. Hemoglobina jest białkiem występującym obficie w czerwonych krwinkach. Zbudowana jest z dwóch kopii globiny α i dwóch kopii globiny β. Każdy z czterech łańcuchów polipeptydowych zawiera cząsteczkę hemu (*czerwony prostokąt*), która stanowi miejsce wiązania tlenu (O_2). Stąd każda cząsteczka hemoglobiny we krwi przenosi cztery cząsteczki tlenu



fosforylowe białko przenośnikowe HPr
katalaza
lizozym
hemoglobina
mioglobina
DNA
deoksyrybonukleaza
cytochrom c
poryna
kolagen
kalmodulina
chymotrypsyna
insulina
dehydrogenaza alkoholowa
karbamoilotransferaza asparaginianowa
5 nm

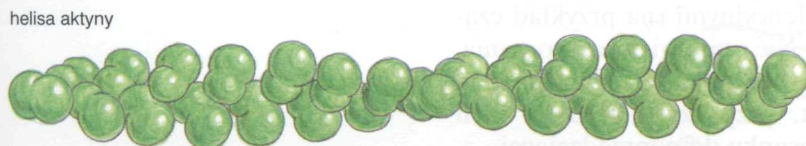
Rys. 5-17 (*sąsiednia strona*) **Przegląd wielkości i struktury przestrzennej białek.** Każde białko przedstawiono za pomocą modelu czaszowego, zachowując tę samą skalę. W lewym górnym rogu — fosforylowane białko przenośnikowe, HPr, zaprezentowane szczegółowo w panelu 5-2 (s. 142—143). (Według: David S. Goodsell, *Our Molecular Nature*. New York: Springer-Verlag, 1996)



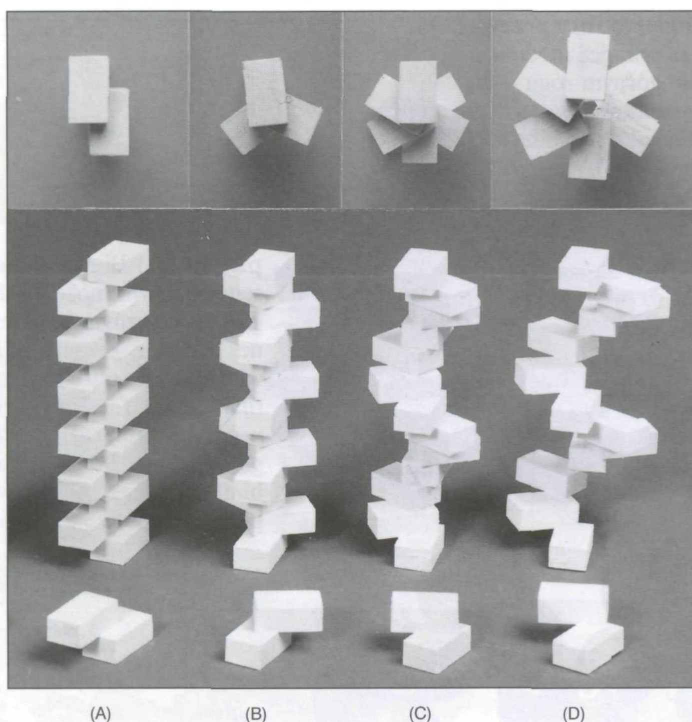
Rys. 5-18. Składanie białek w kompleksy. (A) Białko o jednym tylko miejscu wiążącym może tworzyć dimer z drugim identycznym białkiem. (B) Identyczne białka z dwoma różnymi miejscami wiążącymi często tworzą długi helikalny filament. (C) Jeśli dwa miejsca wiążące są w przybliżeniu rozmieszczone tak, że mogą ze sobą oddziaływać, podjednostki białka zamiast helisy tworzą zamknięty pierścień (patrz rys. 5-15B)

powstać łańcuch utworzony przez identyczne cząsteczki tego białka. Jak omówiono na s. 152, każda cząsteczka białka wiąże się z sąsiednią w identyczny sposób, co umożliwia im zestawianie się w *helisę*, mogącą rozbudowywać się bez końca (rys. 5-18). Ten typ zestawiania się cząsteczek może doprowadzić do utworzenia długiego białkowego filamentu. Na przykład filament aktynowy jest długą helikalną strukturą, utworzoną z wielu cząsteczek białka aktyny (rys. 5-19). Aktyna występuje powszechnie w komórkach eukariotycznych, gdzie tworzy jeden z podstawowych systemów filamentowych cytoszkieletu (rozdz. 16). Inne białka łącząc się tworzą wydłużone płaszczyzny lub cylindry, jak w mikrotubulach cytoszkieletu, lub struktury sferyczne przypominające klatki, jak w białkowych okrywach wirusów.

Wiele złożonych struktur (zestawów supramolekularnych), takich jak wirusy i rybosomy, jest zbudowanych z mieszaniny jednego lub więcej typów białek oraz cząsteczek RNA lub DNA. Wszystkie te struktury (zestawy) można wyizolować w czystej postaci i rozbić na budujące je makrocząsteczki. Wyizolowane składniki można ponownie wymieszać i śledzić ich



Rys. 5-19. Filament aktynowy. Ułożenie cząsteczek białek w strukturę helisy często dotyczy tysięcy tych cząsteczek i zajmuje w komórce obszar mikrometrów



Rys. 5-20. Niektóre właściwości helisy. (A–D) Helisa powstaje, gdy grupa podjednostek wiaże się ze sobą w regularny sposób. *Na dole* przedstawiono oddziaływania między dwiema podjednostkami; *wyżej* — helisy powstające w wyniku zaprezentowanych oddziaływań. Na jeden obrót helisy przypada różna liczba podjednostek: dwie (A), trzy (B) lub sześć (C i D). *Na górze* przedstawiono ułożenie podjednostek, uzyskane dzięki fotografowaniu znad helisy. Należy zauważyć, że helisa (D) jest szersza niż helisa (C), przy czym w obu wypadkach na skręt helisy przypada ta sama liczba podjednostek. (E) Helisa może być prawoskrętna lub lewoskrętna. Warto pamiętać, że standardowe metalowe śruby, które wprowadza się przez obracanie w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara, są prawoskrętne. Zauważ, że helisa po obróceniu do góry nogami zachowuje kierunek skrętu

spontaniczne organizowanie się w wyjściową strukturę. Dowodzi to, że wszystkie informacje niezbędne dla powstania skomplikowanych struktur zawarte są już w samych makrocząsteczkach. Eksperymenty te ukazują, że struktura komórki jest w większości samoorganizująca się: odpowiednia struktura powstanie, gdy zostaną wytworzone odpowiednie białka.

Helisa jest powszechnym motywem konstrukcyjnym struktur biologicznych

Struktury biologiczne powstają często przez połączenie podjednostek bardzo do siebie podobnych — takich jak cząsteczki aminokwasów lub białek — w długie łańcuchy o powtarzających się elementach. Jeśli wszystkie podjednostki są identyczne, to sąsiadując ze sobą w łańcuchu będą do siebie wzajemnie pasowały tylko w jeden sposób, zajmując względem siebie pozycje tak, aby zminimalizować swobodną energię kontaktu między nimi. W tym przypadku, każda podjednostka będzie ustawiona dokładnie w ten sam sposób w stosunku do podjednostek sąsiadujących, tak że podjednostka 3 dopasowuje się do podjednostki 2 w ten sam sposób, w jaki podjednostka 2 dopasowuje się do podjednostki 1, i tak dalej. Ponieważ podjednostki rzadko łączą się w linii prostej, ich zestawianie prowadzi najczęściej do powstania **helisy** – regularnej struktury przypominającej kręcone schody, przedstawionej na rys. 5-20. Zależnie od kierunku skrętu owych schodów, wyróżnia się helisę prawoskrętną lub lewoskrętną (rys. 5-20). Obrócenie helisy do góry nogami nie wpływa na kierunek skręcenia, ale zostaje on zmieniony w lustrzanym odbiciu helisy.

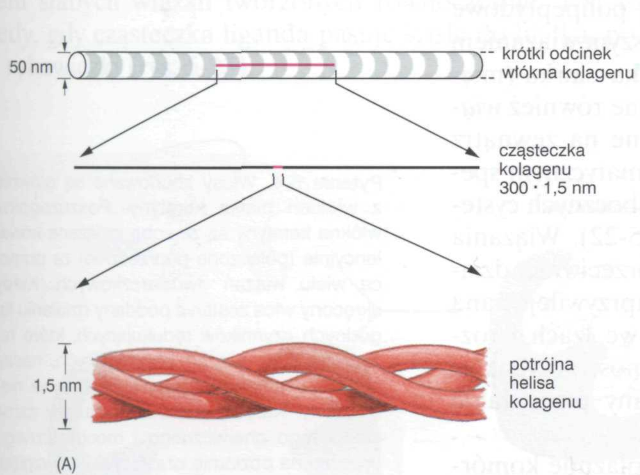
Helisy występują powszechnie w strukturach biologicznych, niezależnie od tego, czy podjednostkami są małe cząsteczki połączone wiązaniami kowalencyjnymi (na przykład aminokwasy w α helisie), czy też duże cząsteczki białek połączone siłami niekowalencyjnymi (na przykład cząsteczki aktyny w filamentach aktynowych). Nie stanowi to zaskoczenia. Helisa nie jest strukturą wyjątkową; powstaje w wyniku zestawienia jedna za drugą wielu podobnych podjednostek, przy czym każda z nich zachowuje ściśle powtarzalne ułożenie w stosunku do poprzedzającej.

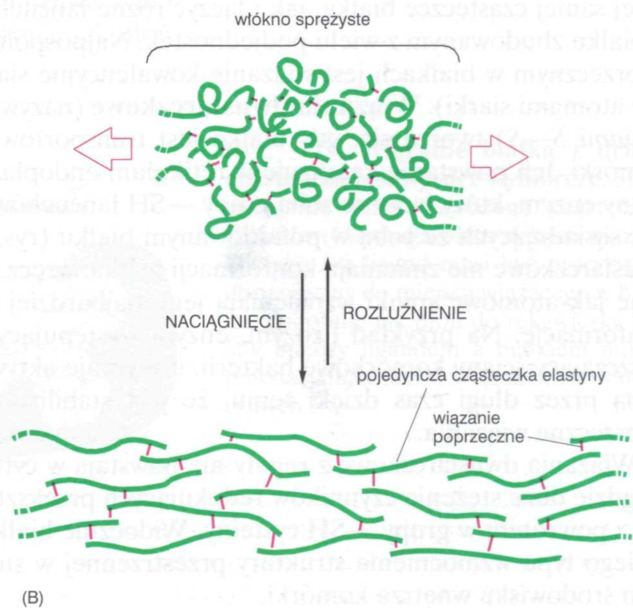
Niektóre typy białek mają kształt wydłużonych włókien

Większość białek omówionych do tej pory to **białka globularne**, w których łańcuch polipeptydowy zwija się w zwartą strukturę przypominającą piłkę z nieregularną powierzchnią. Większość enzymów jest białkami globularnymi: chociaż wiele z nich to duże skomplikowane cząsteczki zbudowane z podjednostek, jako całość mają one kulisty kształt (patrz rys. 5-17). Natomiast inne białka pełnią w komórce funkcje wymagające rozciągnięcia się na znaczną odległość. Białka te powszechnie nazywane **białkami fibrylarnymi**, mają zazwyczaj stosunkowo prostą, wydłużoną strukturę przestrzenną.

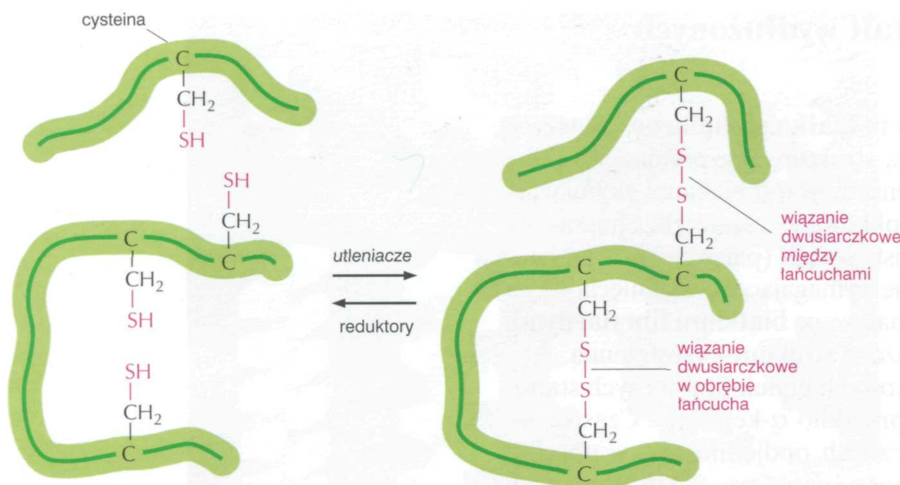
Jedną z dużych klas wewnątrzkomórkowych białek fibrylarnych stanowią białka podobne do wspomnianej uprzednio α-keratyny. Cząsteczka α-keratyny jest dimerem dwóch identycznych podjednostek, w obrębie którego długie α helisy tworzą superhelisę (patrz rys. 5-11). Białka tej klasy tworzą jeden ze składników cytoszkieletu. Ich rejony o postaci superhelisy mają na obu końcach domeny globularne, które zawierają miejsca wiążące. Pozwala to omawianym białkom układać się w *filamenty pośrednie*, które przypominają liny i tworzą strukturalne rusztowanie wnętrza komórki (patrz rozdz. 16). Filamenty keratynowe są niezwykle stabilne: z tego białka zbudowane są głównie struktury o długim czasie trwania, takie jak włosy, rogi i paznokcie.

Białka fibrylarne występują szczególnie obficie na zewnątrz komórki, gdzie tworzą *matriks zewnątrzkomórkową* o konsystencji żelu, która ułatwia grupom komórek połączenie się w tkanki. Białka te podlegają sekrecji z wnętrza komórki na zewnątrz, gdzie zazwyczaj układają się w struktury dywanowe lub włókna. Wśród tego typu białek fibrylarnych w tkankach zwierząt najbardziej rozpowszechniony jest *kolagen*. Cząsteczka kolagenu składa się z trzech długich łańcuchów polipeptydowych, w których co trzecią pozycję zajmuje niepolarny aminokwas glicyna. Ta regularna struktura pozwala łańcuchom owinąć się nawzajem, co prowadzi do powstania długiej, regularnej potrójnej helisy (rys. 5-21). Wiele cząsteczek kolagenu wiąże się następnie ze sobą bokami i końcami, tworząc długie nakładające się szeregi — w ten sposób powstają niezwykle odporne włókna kolagenu, które utrzymują spójność tkanek, jak opisano w rozdz. 19.





Rys. 5-21. Kolagen i elastyna. (A) Kolagen jest potrójną helisą, tworzoną przez trzy długie łańcuchy białkowe, które owijają się wokół siebie. Wiele cząsteczek kolagenu o kształcie pręcika łączy się poprzecznie ze sobą w przestrzeni międzykomórkowej, tworząc nierozciągliwe włókna kolagenu (*na górze*) o wytrzymałości stali. Prążkowanie na włóknie kolagenu jest skutkiem regularnie powtarzającego się ułożenia cząsteczek kolagenu w obrębie włókna. (B) Łańcuchy polipeptydowe elastyny są poprzecznie połączone, co prowadzi do powstania elastycznych włókien o konsystencji przypominającej gumę. Każda cząsteczka elastyny rozwija się w bardziej rozciągniętą konformację, kiedy włókno sprężyste rozciąga się, i spontanicznie powraca do zwiniętej postaci, gdy czynnik rozciągający przestaje działać



Rys. 5-22. Wiązania dwusiarczkowe. W taki sposób między dwoma sąsiadującymi ze sobą łańcuchami bocznymi cysteiny powstają kowalencyjne wiązania dwusiarczkowe. Jak pokazano, te poprzeczne połączenia mogą powstać między dwiema dowolnymi częściami tego samego łańcucha polipeptydowego lub między dwoma różnymi łańcuchami polipeptydowymi. Ponieważ energia niezbędna do rozerwania jednego wiązania kowalencyjnego jest dużo większa niż energia potrzebna do zerwania nawet całej sieci wiązań niekowalencyjnych (patrz tab. 2-2, s. 43), wiązanie dwusiarczkowe może być głównym czynnikiem stabilizującym białko

Inne białko występujące w matriks zewnątrzkomórkowej — *elastyna* całkowicie różni się od kolagenu. Cząsteczkę elastyny tworzą łańcuchy peptydowe stosunkowo rozluźnione i pozbawione struktury, połączone wiązaniami kowalencyjnymi w elastyczną sieć o konsystencji przypominającej gumę. Powstające w ten sposób włókna sprężyste pozwalają skórze i innym tkankom, takim jak naczynia i płuca, rozciągać się i kurczyć bez groźby rozerwania. Jak przedstawiono na rysunku 5-21B, ta elastyczność wynika ze zdolności poszczególnych cząsteczek białka do odwracalnego rozciągania się, ilekroć ulegają naprężeniu.

Białka zewnątrzkomórkowe są zazwyczaj stabilizowane przez poprzeczne wiązania kowalencyjne

Cząsteczki wielu białek są przyczepiane do zewnętrznej powierzchni błony komórkowej lub kierowane na drodze sekrecji do matriks zewnątrzkomórkowej. Wszystkie te białka podlegają działaniu warunków panujących na zewnątrz komórki. W utrzymaniu ich struktury przestrzennej istotną rolę odgrywają poprzeczne wiązania kowalencyjne, stabilizujące łańcuchy polipeptydowe. Połączenia takie mogą zarówno wiązać dwa aminokwasy w tej samej cząsteczce białka, jak i łączyć różne łańcuchy polipeptydowe w białku zbudowanym z wielu podjednostek. Najpospolitszym wiązaniem poprzecznym w białkach jest wiązanie kowalencyjne siarka–siarka (między atomami siarki). **Wiązania dwusiarczkowe** (nazywane również *wiązaniami S—S*) tworzą się, gdy białko jest transportowane na zewnątrz komórki. Ich powstanie katalizuje w retikulum endoplazmatycznym specjalny enzym, który łączy ze sobą grupy —SH łańcuchów bocznych cysteiny, sąsiadujących ze sobą w pofałdowanym białku (rys. 5-22). Wiązania dwusiarczkowe nie zmieniają konformacji białka, wręcz przeciwnie, działając jak atomowe spinki wzmacniają jego najbardziej uprzywilejowaną konformację. Na przykład lizozym, enzym występujący we łzach i rozpuszczający ściany komórkowe bakterii, utrzymuje aktywność antybakteryjną przez długi czas dzięki temu, że jest stabilizowany przez takie poprzeczne wiązania.

Wiązania dwusiarczkowe z reguły nie powstają w cytoplazmie komórki, gdzie duże stężenie czynników redukujących przekształca takie wiązania z powrotem w grupy —SH cysteiny. Widocznie białka nie potrzebują takiego typu wzmocnienia struktury przestrzennej w stosunkowo łagodnym środowisku wnętrza komórki.

Pytanie 5-4. Włosy zbudowane są głównie z włókien białka keratyny. Poszczególne włókna keratyny są ze sobą związane kowalencyjnie (połączone poprzecznie) za pomocą wielu wiązań dwusiarczkowych. Kiedy skręcony włos zostanie poddany działaniu łagodnych czynników redukujących, które rozerwą kilka z wiązań poprzecznych, naciągnięty i następnie utleniony, pozostanie nieskręcony. Narysuj schemat ilustrujący różne stadia tego chemicznego i mechanicznego procesu na poziomie cząsteczek, z uwzględnieniem wiązań dwusiarczkowych. Wyjaśnij, co by się zdarzyło, gdyby włos poddano działaniu silnego czynnika redukującego, zrywającego wszystkie wiązania dwusiarczkowe?

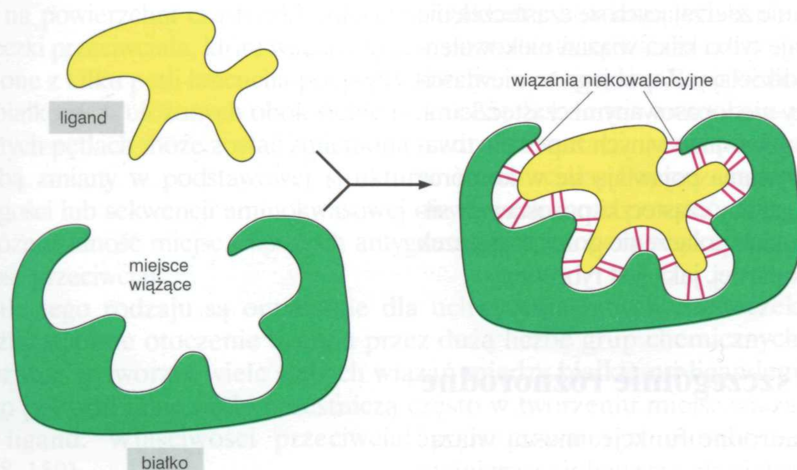
Jak działają białka

Białko każdego rodzaju składa się ze ściśle określonej sekwencji aminokwasów, umożliwiającej jego pofałdowanie się do określonej struktury przestrzennej, czyli konformacji. Ze względu na różnorodne sekwencje aminokwasowe białka mogą tworzyć olbrzymią różnorodność konformacji, z których każda charakteryzuje się unikatową topografią powierzchniowych grup chemicznych. To właśnie dzięki konformacji białko jest zdolne do pełnienia unikatowej funkcji (patrz panel 5-1, s. 135). Pozostaje więc odpowiedzieć na pytanie, jak białka spełniają swoje funkcje. W tej części rozdziału wyjaśnimy, jak białka wiążą się z innymi wybranymi cząsteczkami i w jaki sposób to wiązanie wpływa na ich aktywność. Zdolność wiązania innych cząsteczek umożliwia białkom działanie jako katalizatory, receptory i mikroskopijne motory. Przedstawione w tej części rozdziału przykłady bez wątpienia nie wyczerpują szerokiego repertuaru funkcji białek. Jednakże wiele z opisanych w innych miejscach tej książki wyspecjalizowanych funkcji białek jest oparte na tych samych zasadach.

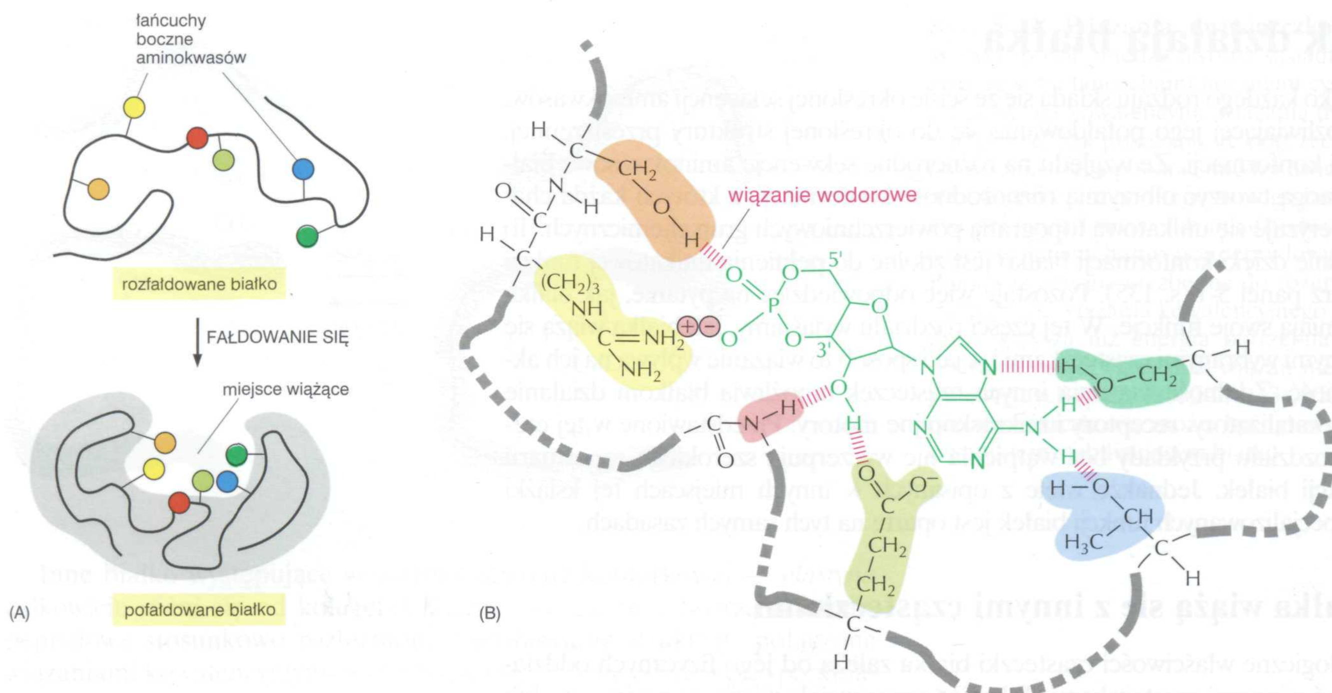
Białka wiążą się z innymi cząsteczkami

Biologiczne właściwości cząsteczki białka zależą od jego fizycznych oddziaływań z innymi cząsteczkami. Tak więc przeciwciała wiążą się z wirusami lub bakteriami, co stanowi znak rozpoznawany przez siły obronne organizmu; enzym heksokinaza dopiero po przyłączeniu glukozy i ATP katalizuje reakcję między nimi; cząsteczki aktyny wiążą się ze sobą tworząc filamenty aktynowe i tak dalej. Faktycznie wszystkie białka „sklejają się", czyli *wiążą się*, z innymi cząsteczkami. W niektórych przypadkach wiązanie to jest bardzo trwałe, w innych słabe lub krótkotrwałe. Jednakże jest ono zawsze *specyficzne*, co oznacza, że każda cząsteczka białka może wiązać tylko jedną lub kilka cząsteczek spośród wielu tysięcy, jakie napotyka. Niezależnie od tego, czy cząsteczka wiązana przez białko jest jonem, małą cząsteczką czy makrocząsteczką, nazywana jest **ligandem** danego białka (łac. *ligare* — wiązać).

Białko wiąże się z ligandem wybiórczo i z dużym powinowactwem dzięki słabym wiązaniom niekowalencyjnym — wiązaniom wodorowym, wiązaniom jonowym i oddziaływaniom van der Waalsa — oraz korzystnym oddziaływaniom hydrofobowym (patrz panel 2-7, s 70-71). Każde pojedyncze wiązanie jest słabe, tak więc skuteczne oddziaływanie wymaga wielu słabych wiązań tworzonych równocześnie. Jest to możliwe tylko wtedy, gdy cząsteczka liganda pasuje ściśle do białka, podobnie jak dłoń do rękawiczki (rys. 5-23).



Rys. 5-23. Wiązanie białka z drugą cząsteczką jest wysoce wybiórcze. Silne związanie białka z drugą cząsteczką (*ligandem*) wymaga wielu słabych wiązań. Dlatego też ligand musi być precyzyjnie dopasowany do miejsca wiążącego w białku, podobnie jak dłoń do rękawiczki, tak aby między ligandem a białkiem mogła powstać duża liczba wiązań niekowalencyjnych



Obszar białka oddziałujący z ligandem nazywa się **miejscem wiążącym** i stanowi zazwyczaj zagłębienie na powierzchni białka, powstające dzięki określonemu ułożeniu aminokwasów. Aminokwasy te znajdują się w oddalonych od siebie obszarach łańcucha polipeptydowego, które zbliżają się do siebie podczas fałdowania się białka (rys. 5-24). Jak przekonamy się później, różne obszary na powierzchni białka mogą tworzyć często miejsca wiążące dla różnych ligandów, regulujących aktywność białka.

Rys. 5-24. Miejsce wiążące białka. (A) Zwijanie się łańcucha polipeptydowego prowadzi zazwyczaj do powstania zagłębienia lub szczeliny na powierzchni białka. Szczelina zawiera grupę aminokwasów ułożonych w ten sposób, że mogą tworzyć wiązania niekowalencyjne tylko z określonymi ligandami. (B) Miejsce wiążące — widok z bliska; przedstawiono wiązania wodorowe i oddziaływania elektrostatyczne powstające między białkiem i jego ligandem (w użytym przykładzie wiązanym ligandem jest cykliczny AMP)

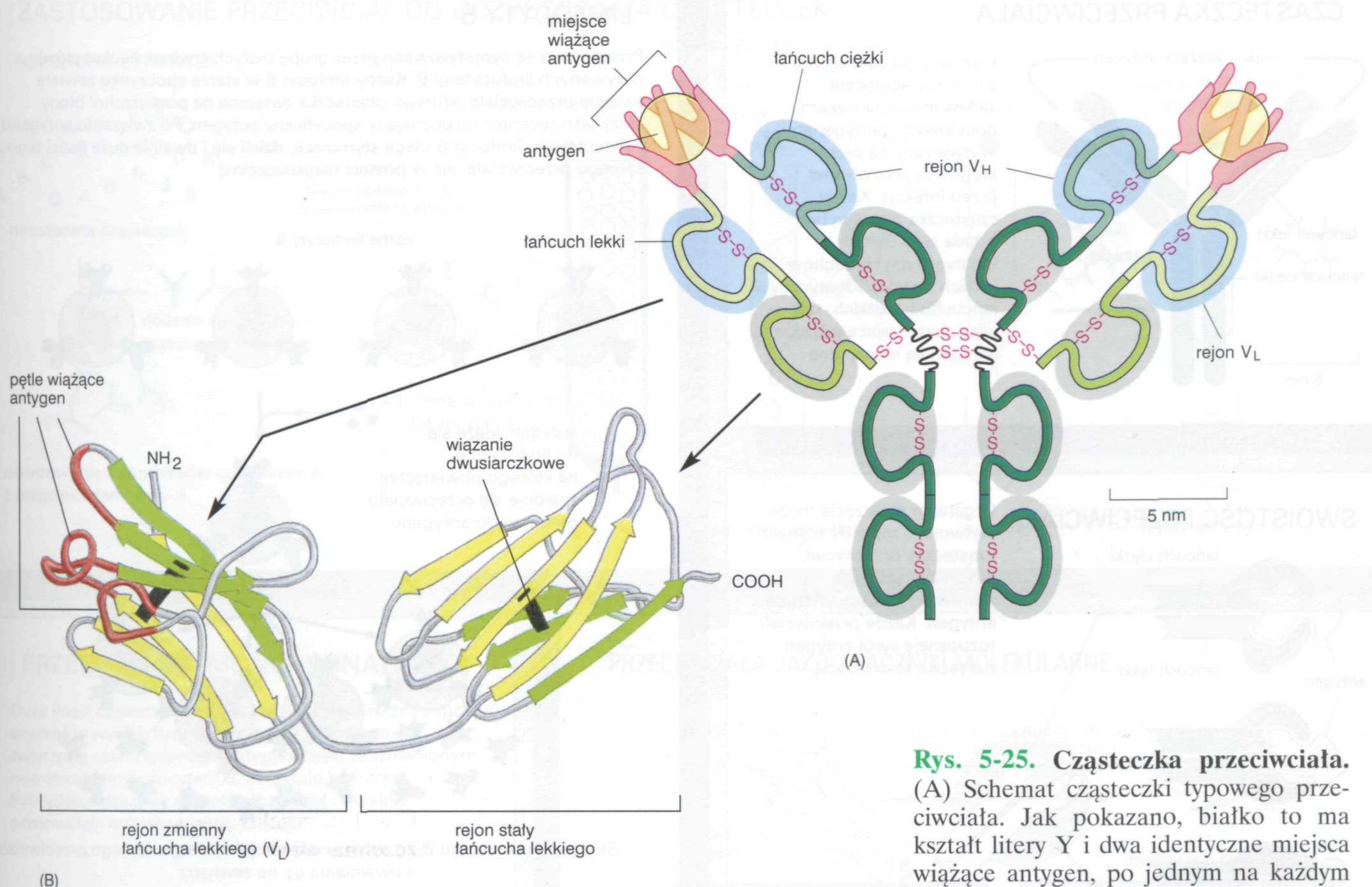
Jeszcze inne części białka mogą okazać się niezbędne do umiejscowienia białka w określonym miejscu w komórce — na przykład hydrofobowa α helisa w białku transbłonowym umożliwia jego wbudowanie w dwuwarstwę lipidową błony komórkowej (patrz rozdz. 11).

Chociaż atomy znajdujące się we wnętrzu cząsteczki białka nie mają bezpośredniego kontaktu z ligandem, tworzą one niezbędne rusztowanie, dzięki któremu powierzchnia białka uzyskuje swój kształt i właściwości chemiczne. Nawet subtelne zmiany w aminokwasach znajdujących się we wnętrzu cząsteczki białka prowadzą często do zmian jego struktury przestrzennej i znoszą zdolność białka do spełniania funkcji.

W rozdziale 3 pokazano, że w komórce cząsteczki kontaktują się z dużą częstością, co wynika stąd, że znajdują się one w ciągłym, przypadkowym ruchu wywołanym energią termiczną. Kiedy powierzchnie zderzających się cząsteczek nie są zbyt dobrze do siebie dopasowane, powstaje tylko kilka wiązań niekowalencyjnych i cząsteczki te szybko się od siebie oddzielają. Zapobiega to niewłaściwym i niepożądanym oddziaływaniom między niedopasowanymi cząsteczkami. Z drugiej strony, wytworzenie wielu wiązań niekowalencyjnych zapewnia trwałe połączenia (patrz rys. 2-28). Silne oddziaływania pojawiają się w komórce zawsze wtedy, gdy biologiczna funkcja wymaga, aby cząsteczki pozostawały silnie związane przez długi czas — kiedy na przykład połączenie grupy cząsteczek prowadzi do powstania struktury supramolekularnej, jaką jest rybosom.

Miejsca wiążące przeciwciał są szczególnie różnorodne

Wszystkie białka, aby wypełniać swe różnorodne funkcje, muszą wiązać określone ligandy. Ta zdolność wiązania wydaje się szczególnie rozwinięta



Rys. 5-25. Cząsteczka przeciwciała. (A) Schemat cząsteczki typowego przeciwciała. Jak pokazano, białko to ma kształt litery Y i dwa identyczne miejsca wiążące antygen, po jednym na każdym ramieniu „Y". Zbudowane jest z czterech łańcuchów polipeptydowych (dwa identyczne łańcuchy ciężkie i dwa identyczne łańcuchy lekkie) utrzymywanych razem przez wiązania dwusiarczkowe. Każdy z łańcuchów składa się z kilku różnych domen, na rysunku zaznaczonych kolorem *niebieskim* lub *szarym*. Miejsce wiążące antygen powstaje dzięki bliskiemu zestawieniu ze sobą rejonu zmiennego łańcucha ciężkiego (V_H) i rejonu zmiennego łańcucha lekkiego (V_L). Rejony te — to domeny, które w cząsteczkach różnych przeciwciał wykazują największą różnorodność sekwencji i struktury. (B) Model wstęgowy łańcucha lekkiego. Części rejonu V_L najbardziej zaangażowane w wiązanie z antygenem zaznaczono kolorem *czerwonym*; tworzą one połowę pętli, które przypominają palce i zwijają się dokoła każdej cząsteczki antygenu, co przedstawiono w części (A)

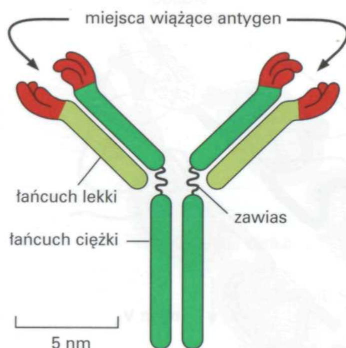
w przypadku białek zaliczanych do rodziny przeciwciał, ponieważ nasze organizmy wytwarzają przeciwciała zdolne do silnego wiązania się prawie z każdą dowolną cząsteczką.

Przeciwciała, czyli immunoglobuliny, są białkami powstającymi w układzie odpornościowym w odpowiedzi na obce cząsteczki, np. te które występują na powierzchni atakujących mikroorganizmów. Każde przeciwciało wiąże się szczególnie mocno z określoną cząsteczką docelową, stąd też inaktywuje ją lub ułatwia jej zniszczenie. Przeciwciało rozpoznaje swój cel (nazywany **antygenem**) ze szczególną swoistością. Ponieważ istnieją miliardy potencjalnych antygenów, z którymi możemy się zetknąć, nasz organizm powinien być zdolny do tworzenia miliardów różnych przeciwciał.

Cząsteczka przeciwciała ma kształt litery Y, z dwoma identycznymi miejscami wiążącymi, z których każde jest komplementarne do niewielkiego obszaru na powierzchni cząsteczki antygenu. Dokładne zbadanie tych miejsc cząsteczki przeciwciała, które wiążą antygen, pozwala stwierdzić, że utworzone są one z kilku pętli łańcucha polipeptydowego, wystających z końców domen białkowych ułożonych obok siebie (rys. 5-25). Sekwencja aminokwasowa w tych pętlach może zostać zmieniona na drodze mutacji, co nie pociąga za sobą zmiany w podstawowej strukturze przeciwciała. Poprzez zmiany w długości lub sekwencji aminokwasowej owych pętli może powstać olbrzymia różnorodność miejsc wiążących antygen i tym sposobem wielka różnorodność przeciwciał.

Pętle tego rodzaju są optymalne dla uchwycenia innych cząsteczek. Umożliwiają one otoczenie liganda przez dużą liczbę grup chemicznych, co pozwala wytworzyć wiele słabych wiązań między białkiem i ligandem. Z tego powodu takie pętle uczestniczą często w tworzeniu miejsc wiążących ligand. Właściwości przeciwciał podsumowano w panelu 5-3 (s. 158–159).

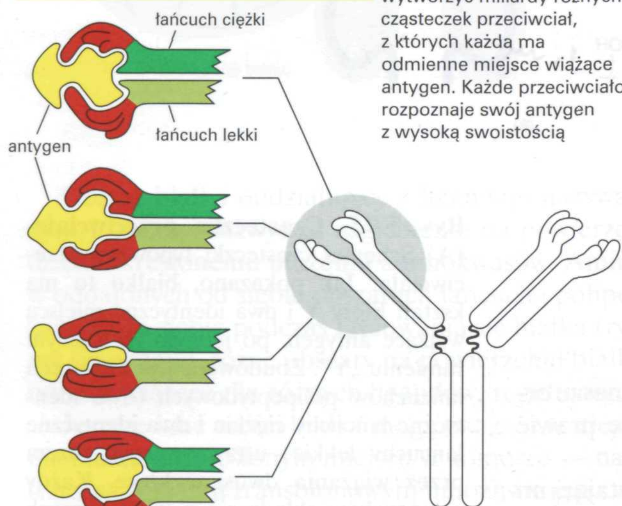
CZĄSTECZKA PRZECIWCIAŁA



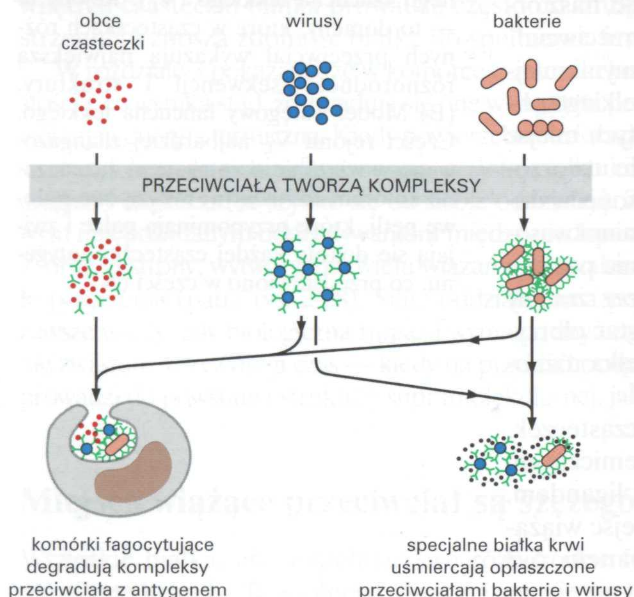
Przeciwciała są białkami silnie wiążącymi się ze swoimi cząsteczkami docelowymi (antygenami). Wytwarzane są przez kręgowce jako obrona przed infekcją. Każda cząsteczka przeciwciała składa się z dwóch identycznych łańcuchów lekkich i dwóch identycznych łańcuchów ciężkich; tak więc dwa miejsca wiążące antygen są identyczne

SWOISTOŚĆ PRZECIWCIAŁA

Organizm zwierzęcia może wytworzyć miliardy różnych cząsteczek przeciwciał, z których każda ma odmienne miejsce wiążące antygen. Każde przeciwciało rozpoznaje swój antygen z wysoką swoistością



PRZECIWCIAŁA BRONIĄ NAS PRZED INFEKCJĄ

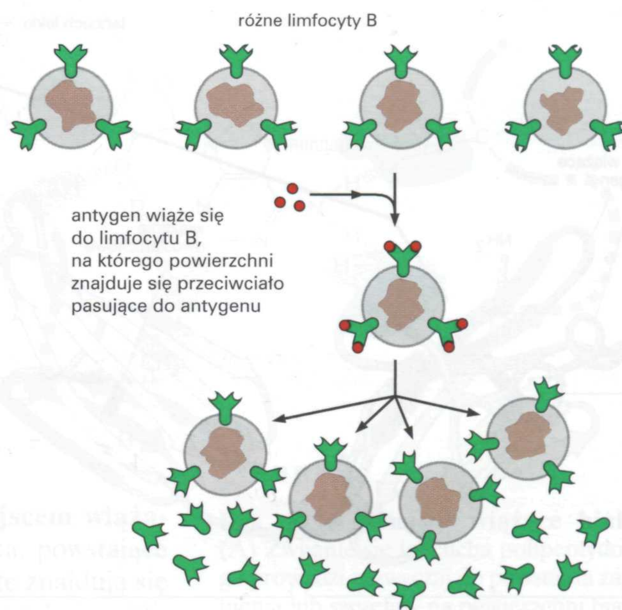


komórki fagocytujące degradują kompleksy przeciwciała z antygenem

specjalne białka krwi uśmiercają opłaszczone przeciwciałami bakterie i wirusy

LIMFOCYTY B

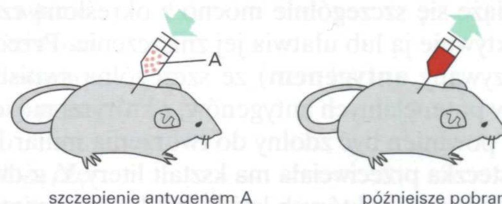
Przeciwciała są syntetyzowane przez grupę białych krwinek (leukocytów), nazywanych limfocytami B. Każdy limfocyt B w stanie spoczynku zawiera swoiste przeciwciało, którego cząsteczka związana na powierzchni błony służy jako receptor rozpoznający specyficzny antygen. Po związaniu antygenu z receptorem, limfocyt B ulega stymulacji, dzieli się i uwalnia duże ilości tego samego przeciwciała, ale w postaci rozpuszczalnej



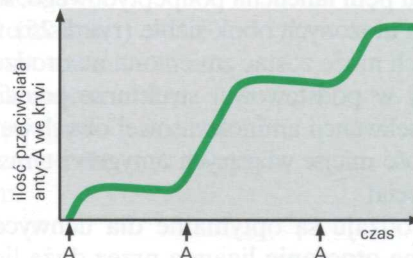
Stymulacja limfocytu B do syntezy większej ilości tego samego przeciwciała i uwalniania go na zewnątrz

WYTWARZANIE PRZECIWCIAŁ U ZWIERZĄT

Przeciwciała można otrzymać w laboratorium poprzez zaszczepienie organizmu zwierzęcia (najczęściej mysz, królik, owca lub gęś) dowolnym antygenem (A)



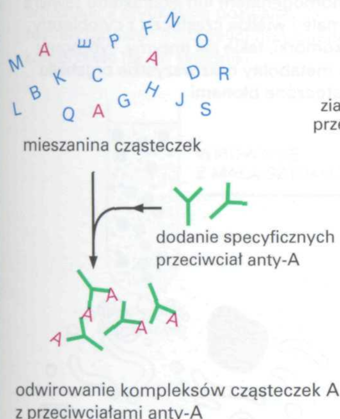
Powtarzane w odstępach kilku tygodni szczepienie tym samym antygenem stymuluje specyficzne limfocyty B do uwalniania dużych ilości przeciwciała anty-A (skierowanego przeciwko antygenowi A) do krwiobiegu



Ponieważ antygen A stymuluje wiele różnych limfocytów B, krew zawiera różnorodne przeciwciała anty-A, z których każde wiąże A w nieco inny sposób

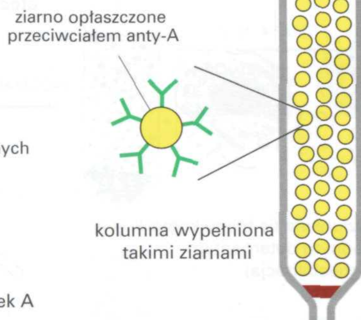
ZASTOSOWANIE PRZECIWCIAŁ DO OCZYSZCZANIA CZĄSTECZEK

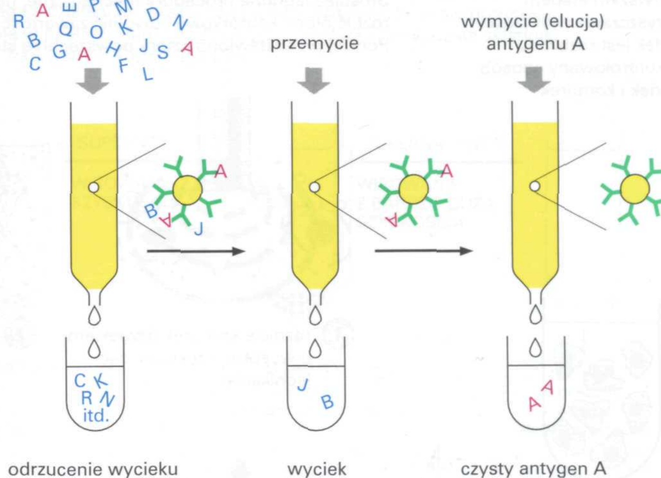
IMMUNOPRECYPITACJA



odwirowanie kompleksów cząsteczek A z przeciwciałami anty-A

KOLUMNOWA CHROMATOGRAFIA IMMUNOPOWINOWACTWA





odrzucenie wycieku

wyciek

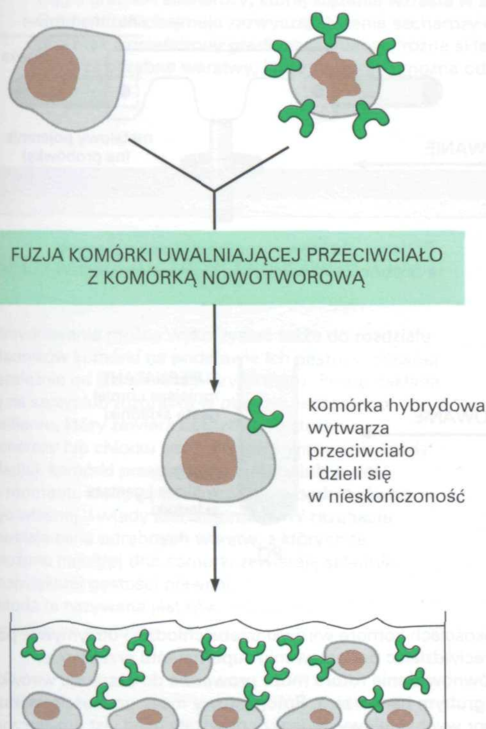
czysty antygen A

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE

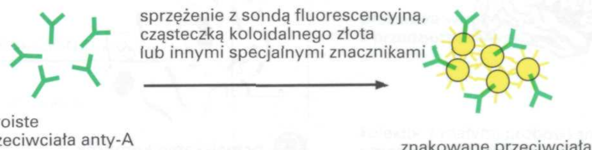
Duże ilości cząsteczek przeciwciała jednego rodzaju można uzyskać w wyniku fuzji limfocytu B (pobranego od zwierzęcia zaszczepionego antygenem A) ze zmienionym nowotworowo limfocytem B. Powstała komórka hybrydowa dzieli się w nieskończoność i uwalnia przeciwciało anty-A jednego rodzaju

komórka nowotworowa z hodowli komórek dzieli się w nieskończoność, ale nie wytwarza przeciwciała

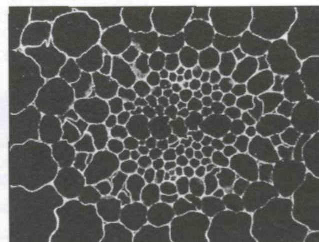
limfocyt B ze zwierzęcia zaszczepionego antygenem A wytwarza przeciwciało anty-A, ale nie dzieli się w nieskończoność



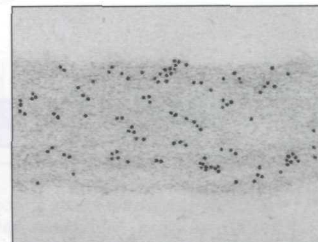
PRZECIWCIAŁA JAKO ZNACZNIKI MOLEKULARNE



WYKRYWANIE MIKROSKOPOWE



Znakowane fluorescencyjnie przeciwciało związane w tkance z antygenem A wykrywa się na podstawie fluorescencji w mikroskopie świetlnym. W przedstawionym przykładzie antygenem jest pektyna występująca w ścianach komórkowych roślin

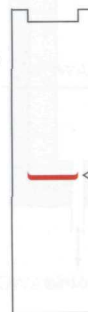


Znakowane złotem przeciwciało związane w tkance z antygenem A wykrywa się w mikroskopie elektronowym. Antygenem jest pektyna występująca w ścianie komórkowej roślin

WYKRYWANIE BIOCHEMICZNE

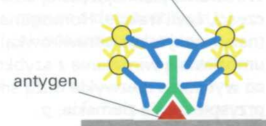


oddzielenie antygenu A od innych cząsteczek przez elektroforezę



wyznaczenie pozycji antygenu A dzięki inkubacji ze znakowanymi przeciwciałami, które wiążą się z tym antygenem

znakowane drugie przeciwciało (*niebieskie*) wiąże się z pierwszym przeciwciałem (*zielone*)



UWAGA: Zastosowanie wielu warstw przeciwciał (sandwicza) w wielu przypadkach pozwala znacznie zwiększyć czułość. Metoda „sandwicza" umożliwia wykrycie mniejszej liczby cząsteczek antygenu.

ROZBICIE KOMÓREK I TKANEK

Pierwszym etapem oczyszczania większości białek jest rozbicie, w kontrolowany sposób, tkanek i komórek

Stosując łagodne procedury mechaniczne, nazywane homogenizacją, można rozbić błony komórkowe i uwolnić zawartość komórek. Poniżej przedstawiono cztery powszechnie stosowane procedury tego typu

Uzyskana gęsta zawiesina (nazywana homogenatem lub ekstraktem) zawiera małe i wielkie cząsteczki z cytoplazmy komórki, takie jak enzymy, rybosomy i metabolity oraz wszystkie organelle otoczone błonami

zawiesina komórek lub tkanka

(1) rozbicie komórek dźwiękiem o wysokiej częstotliwości (sonikacja)

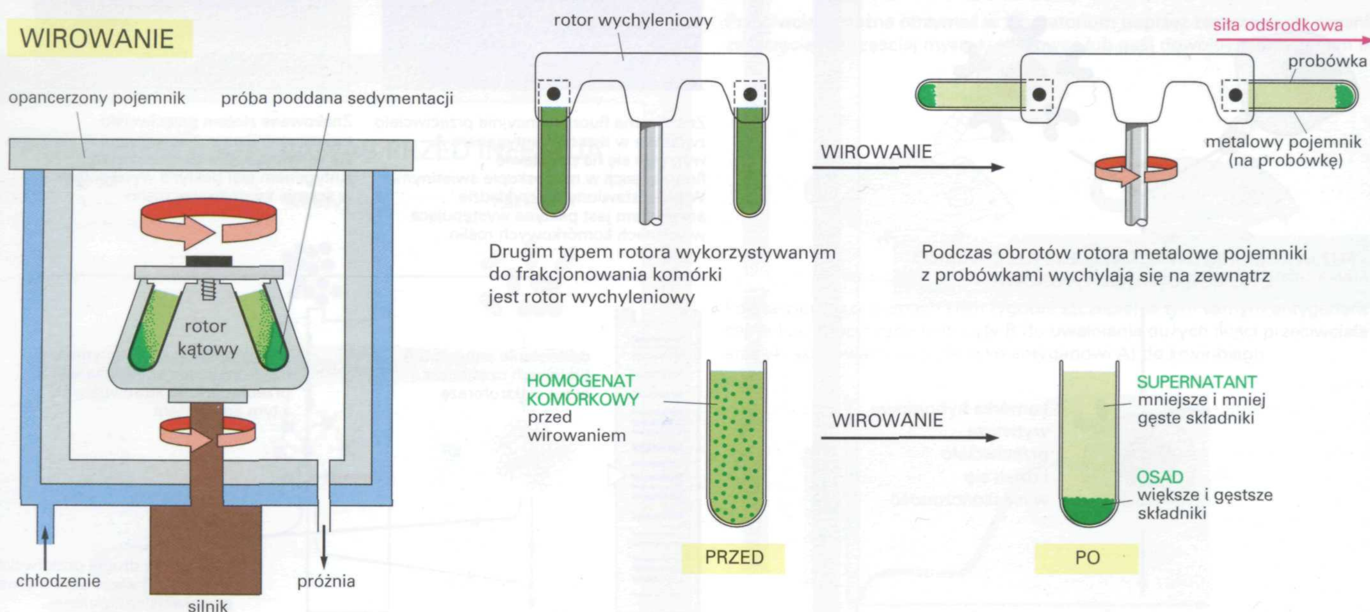
(2) podziurawienie błony komórkowej łagodnym detergentem (permeabilizacja)

(3) przeciskanie komórek przez mały otwór pod wysokim ciśnieniem

(4) ściskanie komórek między ściśle dopasowanym obracającym się tłokiem a ścianami naczynia z grubego szkła

Prawidłowo przeprowadzona homogenizacja pozwala zachować większość organelli otoczonych błonami w stanie nienaruszonym

WIROWANIE



Drugim typem rotora wykorzystywanym do frakcjonowania komórki jest rotor wychyleniowy

Podczas obrotów rotora metalowe pojemniki z probówkami wychylają się na zewnątrz

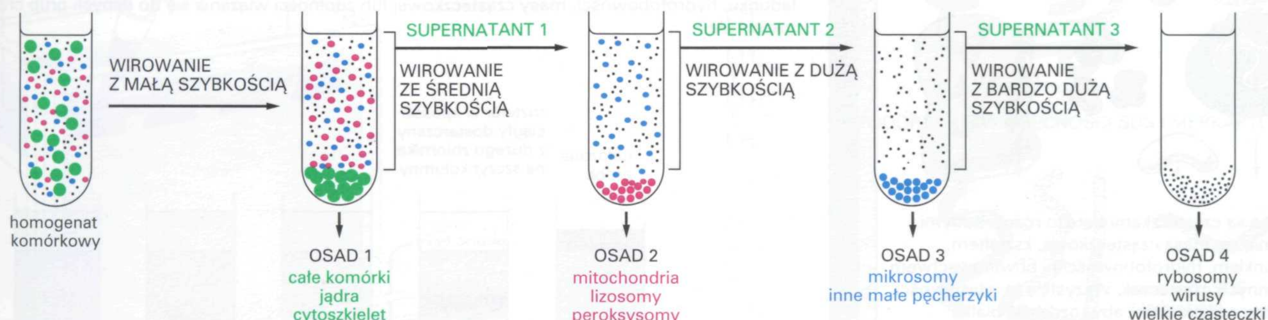
Wirowanie jest najczęściej stosowaną metodą rozdziału homogenatu na różne części, czyli frakcje. Homogenat umieszcza się w probówkach i wiruje w wirówce (nazywanej także ultrawirówką) z dużą szybkością. Obecnie stosowane wirówki umożliwiają wirowanie z szybkością dochodzącą do 100 000 obrotów na minutę, co wytwarza niezwykle dużą siłę odśrodkową, ok. 600 000 razy większą niż przyspieszenie ziemskie, *g*.

Przy takich szybkościach komorę wirówki trzeba chłodzić i utrzymywać pod próżnią, aby przeciwdziałać podgrzewaniu supernatantu przez tarcie. Ponieważ złe zrównoważenie rotora może prowadzić do eksplozji, wirówkę zabezpiecza się grubym pancerzem. Rotor kątowy może pomieścić większe objętości niż rotor wychyleniowy, jednakże powstały osad jest umieszczony skośnie, a nie płasko, na dnie probówki

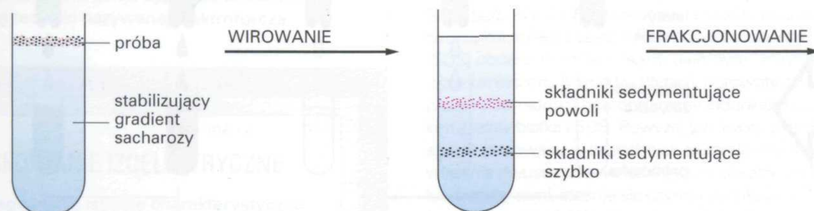
WIROWANIE RÓŻNICOWE

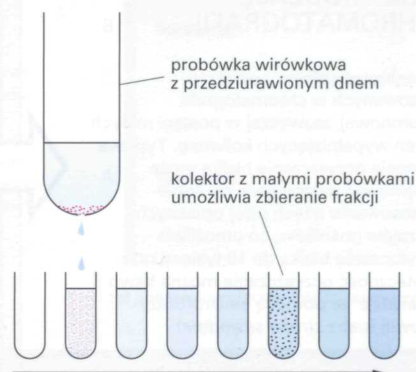
Wirowanie powtarzane ze stopniowo wzrastającą szybkością pozwala rozfrakcjonować (rozdzielić) homogenaty komórkowe na ich składniki

Wirowanie umożliwia rozdział składników komórki na podstawie ich wielkości i gęstości. Składniki większe i gęstsze podlegają działaniu większej siły odśrodkowej i szybciej się poruszają. Dlatego też sedymentują w postaci osadu, podczas gdy mniejsze i mniej gęste składniki pozostają w roztworze, nazywanym supernatantem



SEDYMENTACJA SZYBKOŚCIOWA



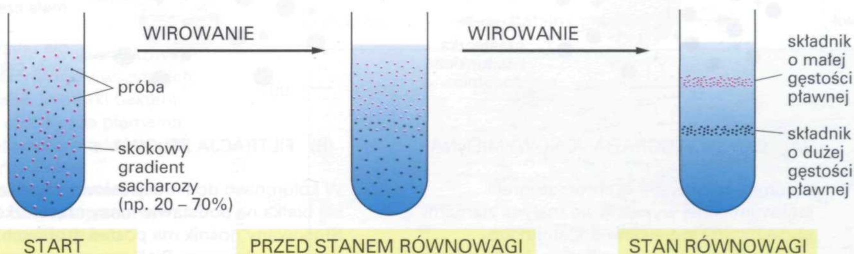


Składniki komórki po nałożeniu na powierzchnię rozcieńczonego roztworu soli sedymentują z różną szybkością, zależnie od wielkości. Aby zapobiec ich konwekcyjnemu mieszaniu się, w stosowanym roztworze przygotowuje się niewielki ciągły gradient sacharozy, której stężenie wzrasta w kierunku do dna probówki. Gradient ten obejmuje zazwyczaj stężenia sacharozy od 5 do 20%. Sedymentując przez tak rozcieńczony gradient sacharozy, różne składniki komórki rozdzielają się i tworzą odrębne warstwy, które nastepnie można oddzielnie zebrać

Po odpowiednim czasie wirowania warstwy można zbierać, najprościej przez przedziurawienie probówki wirówkowej i zbieranie wycieku z dna

SEDYMENTACJA RÓWNOWAGOWA

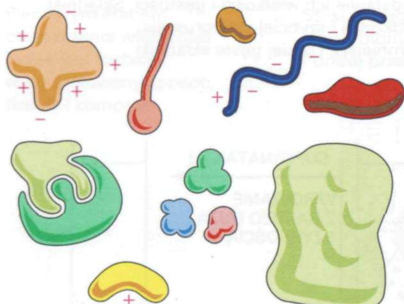
Ultrawirowanie można wykorzystać także do rozdziału składników komórki na podstawie ich gęstości pławnej niezależnie od ich wielkości czy kształtu. Próbę nakłada się na szczyt lub rozprasza w obrębie skokowego gradientu, który zawiera bardzo duże stężenie sacharozy lub chlorku cezu. Podczas wirowania każdy składnik komórki przesuwa się w górę lub w dół, do momentu kiedy gęstość otoczenia będzie równa jego własnej, i wtedy nieruchomieje. W rezultacie powstaje seria odrębnych warstw, z których te położone najbliżej dna komórki zawierają składniki o największej gęstości pławnej.
Metoda ta nazywana jest również wirowaniem w gradiencie gęstości



Na rysunku przedstawiono gradient sacharozy. Gęstsze gradienty, szczególnie przydatne do rozdziału kwasów nukleinowych (DNA i RNA), można uzyskać stosując chlorek cezu

Powstałe warstwy można zbierać z dna probówki, jak pokazano powyżej

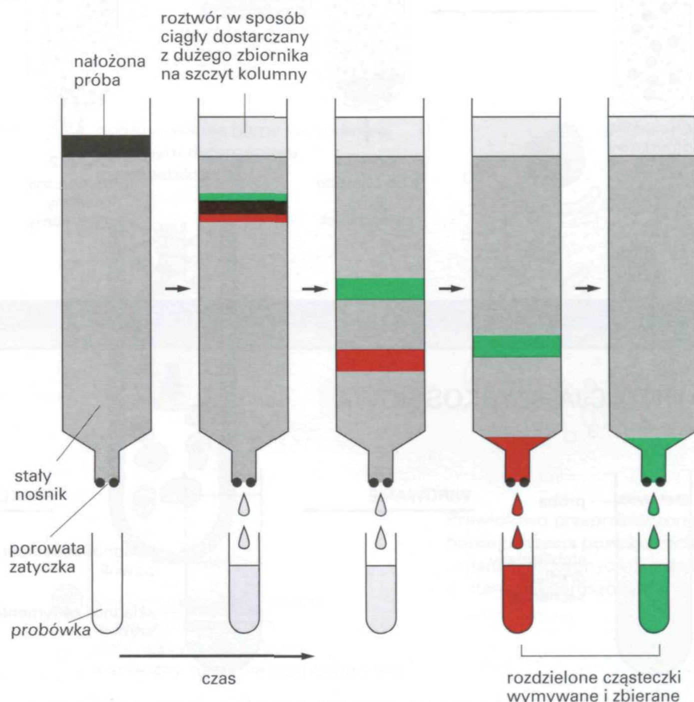
ROZDZIAŁ BIAŁEK



Białka są cząsteczkami bardzo różnorodnymi. Różnią się masą cząsteczkową, kształtem, ładunkiem, hydrofobowością i powinowactwem do innych cząsteczek. Wszystkie te właściwości można wykorzystać, aby rozdzielić białka do postaci umożliwiającej ich indywidualne badanie

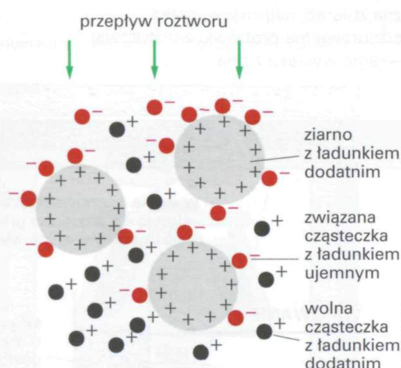
CHROMATOGRAFIA KOLUMNOWA

Do rozdziału białek stosuje się często chromatografię kolumnową. Mieszaninę białek nakłada się na szczyt cylindrycznej kolumny wypełnionej przepuszczalnym stałym nośnikiem zawieszonym w roztworze. Następnie przez kolumnę przepompowuje się znaczną ilość roztworu. Ponieważ na skutek oddziaływań z nośnikiem różne białka są zatrzymywane w różnym stopniu, można je zbierać oddzielnie, kiedy wypływają z kolumny. Zależnie od wyboru nośnika rozdział białek przeprowadza się na podstawie ich ładunku, hydrofobowości, masy cząsteczkowej lub zdolności wiązania się do danych grup chemicznych (patrz *niżej*)



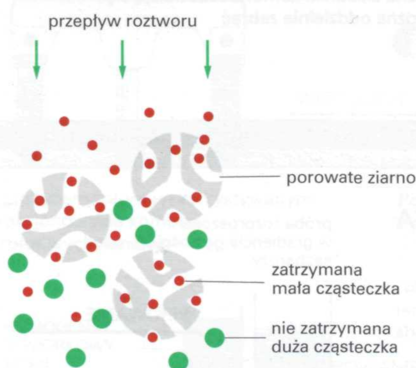
TRZY RODZAJE CHROMATOGRAFII

Istnieje wiele typów nośników stosowanych w chromatografii kolumnowej, zazwyczaj w postaci małych ziaren wypełniających kolumnę. Typowa strategia oczyszczania białka może obejmować następujące po sobie zastosowanie trzech niżej opisanych rodzajów nośników, co umożliwia oczyszczenie białka do 10 tysięcy razy. Skuteczność oczyszczania można łatwo sprawdzić za pomocą elektroforezy żelowej (patrz *strona sąsiednia*)



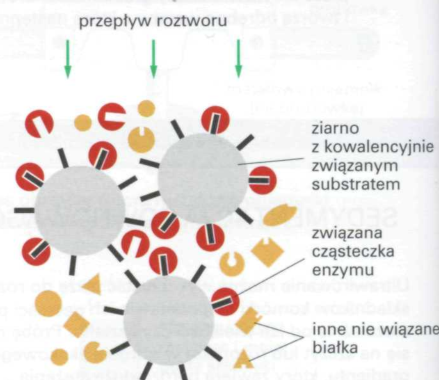
(A) CHROMATOGRAFIA JONOWYMIENNA

Kolumny stosowane w chromatografii jonowymiennej wypełnia się małymi ziarnami obdarzonymi ładunkiem dodatnim lub ujemnym, dzięki czemu zatrzymują one białka o przeciwnym ładunku. Wiązanie białka z nośnikiem zależy od pH i siły jonowej roztworu przepuszczanego przez kolumnę. Parametry te można zmieniać w kontrolowany sposób, aby osiągnąć skuteczny rozdział



(B) FILTRACJA ŻELOWA

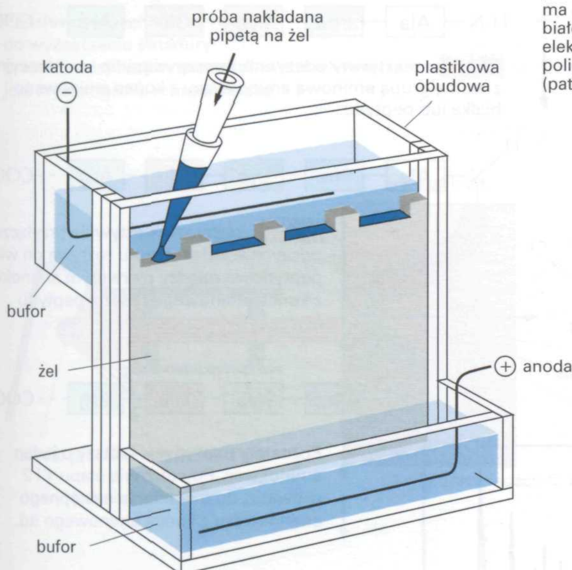
W kolumnach do filtracji żelowej rozdziela się białka na podstawie masy cząsteczkowej. Stosowany nośnik ma postać drobnych porowatych ziaren. Białka wystarczająco małe, aby wejść do kanalików w ziarnach, migrują wolniej przez kolumnę. Białka nie mieszczące się w kanalikach ziaren są wymywane z kolumny jako pierwsze. Kolumny takie pozwalają także oszacować masę cząsteczkową białka



(C) CHROMATOGRAFIA POWINOWACTWA

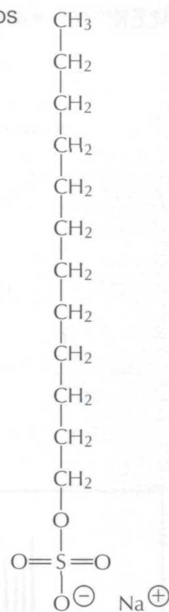
Kolumny stosowane w chromatografii powinowactwa zawierają nośnik sprzężony kowalencyjnie z cząsteczką specyficznie oddziałującą z danym białkiem (np. przeciwciało lub substrat enzymu). Białka wiążące się specyficznie z taką kolumną mogą zostać z niej uwolnione w wysoce oczyszczonej postaci na skutek zmiany pH lub przez zastosowanie stężonych roztworów soli

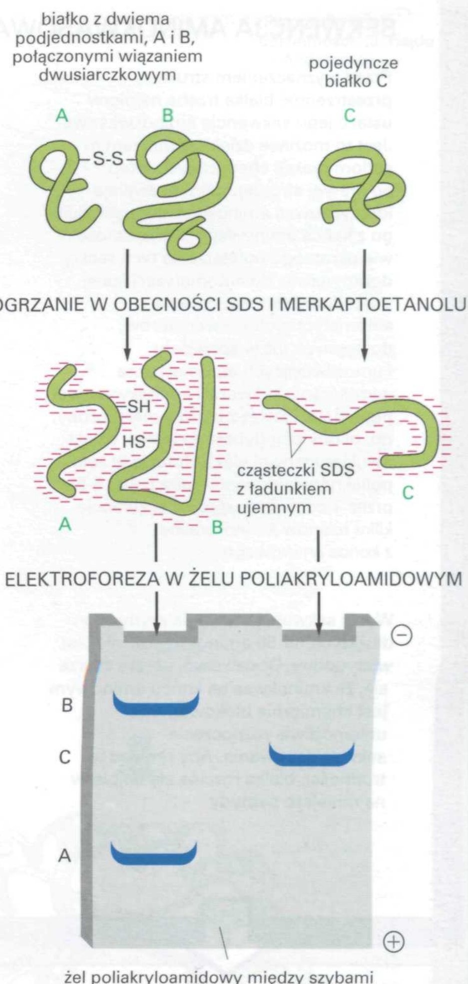
ELEKTROFOREZA ŻELOWA



Cząsteczki białek w polu elektrycznym *migrują* z szybkością *zależną od ich masy cząsteczkowej* i wypadkowego ładunku; od tego ostatniego zależy też kierunek ruchu. Zjawisko to stanowi podstawę techniki nazywanej **elektroforezą**

Obecność detergentu SDS (dodecylosiarczan sodu) ma na celu solubilizację białek poddawanych elektroforezie w żelu poliakryloamidowym (patrz *poniżej*)



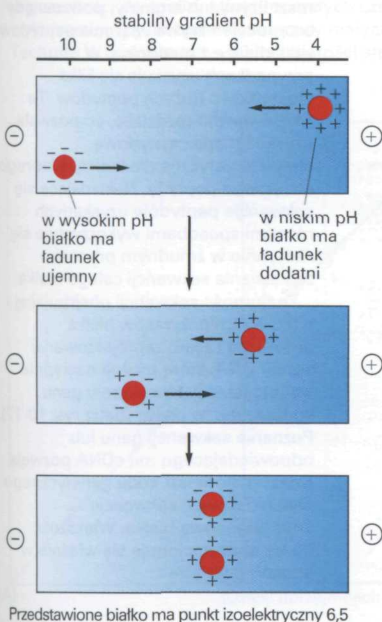


Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS (SDS-PAGE). Poszczególne łańcuchy polipeptydowe tworzą kompleks z cząsteczkami dodecylosiarczanu sodu (SDS) obdarzonymi ładunkiem ujemnym i migrują przez umieszczony między płytami porowaty żel poliakryloamidowy jako obdarzone ładunkiem ujemnym kompleksy białka i SDS. Powyżej (*po lewej*) przedstawiono aparat stosowany w tej technice elektroforezy. Aby rozbić wiązania dwusiarczkowe istniejące w obrębie białek lub między nimi, stosuje się czynnik redukujący (merkaptoetanol). W tych warunkach białka migrują z szybkością zależną od ich masy cząsteczkowej

OGNISKOWANIE IZOELEKTRYCZNE

Dla każdego białka istnieje charakterystyczna wartość pH, nazywana **punktem izoelektrycznym**, przy której ładunek wypadkowy białka wynosi zero, co powoduje brak migracji tego białka w polu elektrycznym.

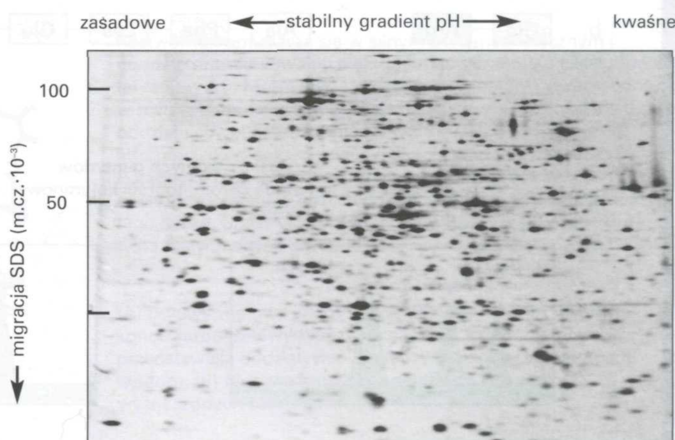
W **ogniskowaniu izoelektrycznym** białka poddaje się elektroforezie w wąskich rurkach z żelem poliakryloamidowym, zawierającym gradient pH, ustalony przez mieszanie specjalnych buforów. Każde białko zatrzymuje się w żelu po dotarciu do miejsca o pH równym wartości jego punktu izoelektrycznego



Przedstawione białko ma punkt izoelektryczny 6,5

DWUKIERUNKOWA ELEKTROFOREZA W ŻELU POLIAKRYLOAMIDOWYM

Złożonej mieszaniny białek nie można dobrze rozdzielić na jednokierunkowym żelu. **Dwukierunkowa elektroforeza żelowa**, łącząca w sobie dwie różne metody rozdziału, pozwala rozdzielić ponad tysiąc białek do postaci dwuwymiarowej mapy. W pierwszym etapie, wykorzystującym ogniskowanie izoelektryczne, natywne białka rozdziela się w wąskich rurkach z żelem na podstawie ich ładunku wypadkowego (patrz *na lewo*). Następnie żel wyciągnięty z rurki umieszcza się na szczycie żelu zawartego między szybami i białka poddaje się rozdziałowi metodą SDS-PAGE (patrz *powyżej*) w kierunku prostopadłym do użytego w pierwszym etapie. Każde białko migrując tworzy odrębną plamę

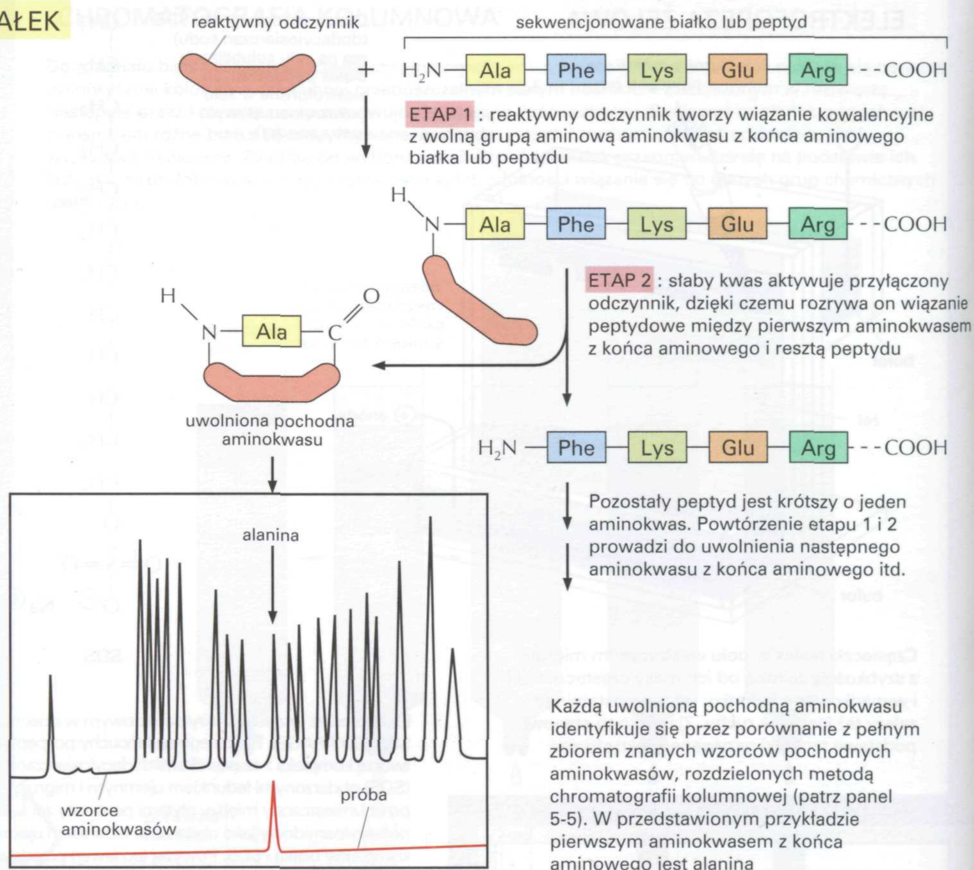


Wynik dwukierunkowej elektroforezy wszystkich białek komórki bakterii *E. coli*. Każda plama na żelu odpowiada innemu łańcuchowi polipeptydowemu. W kierunku poziomym, z lewa na prawo łańcuchy te rozdzielono na podstawie wartości punktu izoelektrycznego, a w kierunku pionowym, z góry ku dołowi zależnie od ich masy cząsteczkowej. (Dzięki uprzejmości: Patrick O'Farrell)

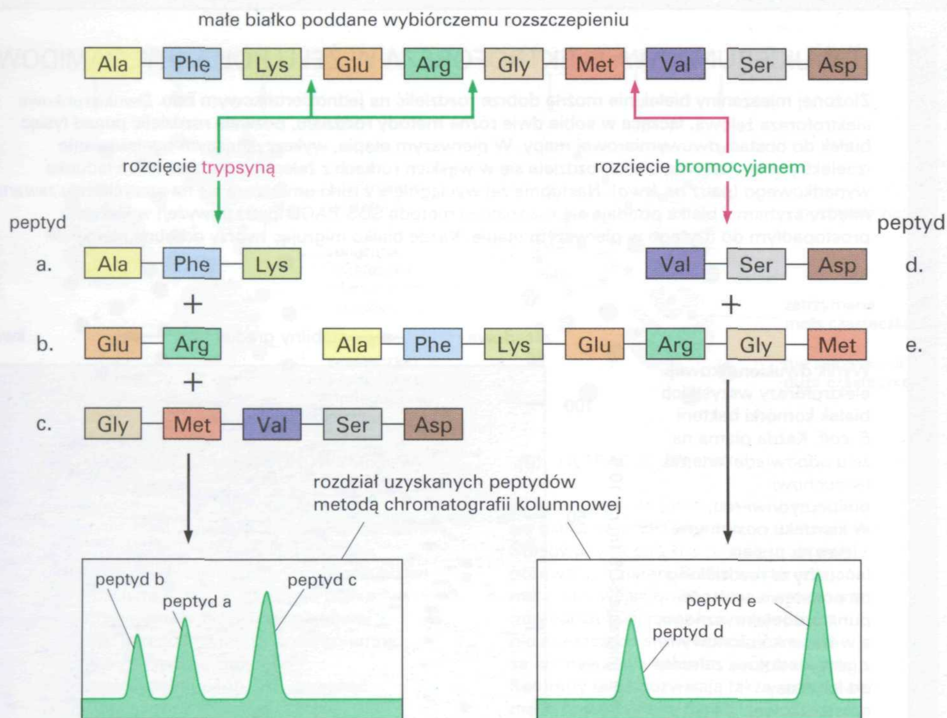
SEKWENCJA AMINOKWASOWA BIAŁEK

Przed wyznaczeniem struktury przestrzennej białka trzeba najpierw ustalić jego sekwencję aminokwasową. Jest to możliwe dzięki powtarzanym seriom reakcji chemicznych (etap 1 i 2, *po prawej* stronie), które pozwalają *identyfikować aminokwas po usunięciu* go z końca aminowego. Konieczność wielokrotnego powtarzania tych reakcji doprowadziła do automatyzacji całej procedury i skonstruowania automatycznych sekwenatorów, dostępnych już w sprzedaży i umożliwiających automatyczne wyznaczanie sekwencji aminokwasowej peptydów. Nawet z bardzo małej próby, np. plamy pojedynczego białka, dzięki dwukierunkowej elektroforezie w żelu poliakryloamidowym (patrz panel 5-5) przez noc można uzyskać sekwencję kilku tuzinów aminokwasów z końca aminowego

Wynik sekwencjonowania peptydów dłuższych niż 50 aminokwasów nie jest wiarygodny. Dodatkowo, często zdarza się, że aminokwas na końcu aminowym jest chemicznie blokowany, co uniemożliwia rozpoczęcie sekwencjonowania. Aby ominąć te trudności, białka rozcina się najpierw na mniejsze peptydy



WYBIÓRCZE ROZSZCZEPIENIE BIAŁKA

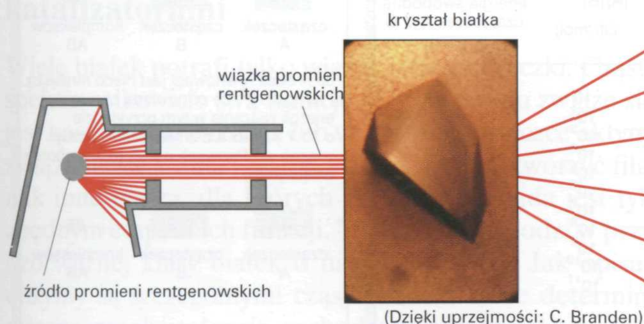


Wybiórcze rozszczepienie białka prowadzi do powstania zbioru odrębnych peptydów. Do zerwania wiązań między specyficznymi resztami aminokwasów można zastosować enzymy hydrolizujące białka (proteolityczne) lub odczynniki chemiczne. Na przykład enzym trypsyna tnie po karboksylowej stronie reszt lizyny lub argininy, podczas gdy bromocyjan zrywa wiązania peptydowe sąsiadujące z metioniną. W obu przypadkach uzyskuje się kilka stosunkowo dużych peptydów. Te z kolei można rozdzielić, co pozwala uzyskać mapę peptydową, charakterystyczną dla białka, z którego otrzymano peptydy. Nakładające się sekwencje peptydów uzyskanych różnymi sposobami wykorzystuje się następnie w żmudnym procesie zestawiania sekwencji całego białka.

Znajomość sekwencji obejmującej tylko 20 aminokwasów białka umożliwia często zaprojektowanie sondy DNA, którą można następnie wykorzystać w klonowaniu genu kodującego to białko (patrz rys. 10-17). Poznanie sekwencji genu lub odpowiadającego mu cDNA pozwala dzięki znajomości kodu genetycznego wywnioskować sekwencję aminokwasową białka. Większość białek sekwencjonuje się właśnie w sposób pośredni

KRYSTALOGRAFIA RENTGENOWSKA

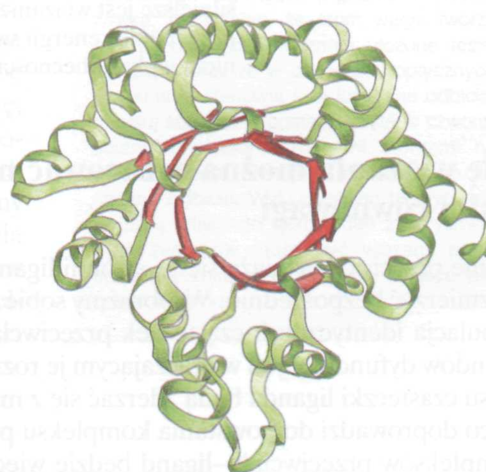
Podstawową techniką używaną do wyznaczania struktury przestrzennej białka na poziomie atomowym jest krystalografia rentgenowska



(Dzięki uprzejmości: C. Branden)

(Fotografia dzięki uprzejmości: J. Hajdu i I. Andersson)

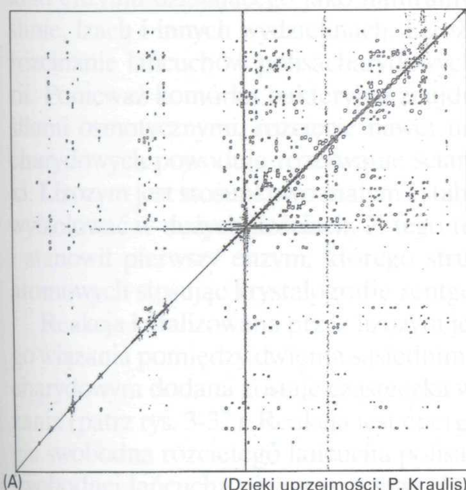
Promienie rentgenowskie, podobnie jak światło, stanowią promieniowanie elektromagnetyczne, ale o bardzo małej długości fali. Skierowanie wąskiej i równoległej wiązki promieni rentgenowskich na wysoce uorganizowany kryształ oczyszczonego białka prowadzi do rozproszenia (dyfrakcji) części wiązki na atomach białka. Promienie ulegające rozproszeniu wzmacniają się wzajemnie w pewnych punktach, co rejestruje się za pomocą odpowiedniego detektora promieni rentgenowskich – jako układ plamek dyfrakcyjnych. Położenie i intensywność każdej plamki dyfrakcyjnej na rentgenogramie informuje o rozmieszczeniu w krysztale białka atomów będących jej źródłem. Informacja ta może zostać przetworzona przez komputer w przestrzenną mapę gęstości elektronowej cząsteczki białka, która wraz z sekwencją białka wykorzystuje się do wykonania modelu atomowego. Zazwyczaj trudno jest interpretować model atomowy całego białka, dlatego też wykonuje się wersje uproszczone, przedstawiające istotne cechy strukturalne (patrz panel 5-2, s. 142 – 143). Jako przykład zaprezentowano karboksylazę rybulozobisfosforanową, enzym odgrywający kluczową rolę w asymilacji CO_2 podczas fotosyntezy (α helisy oznaczono na *zielono*, a nici β na *czerwono*)

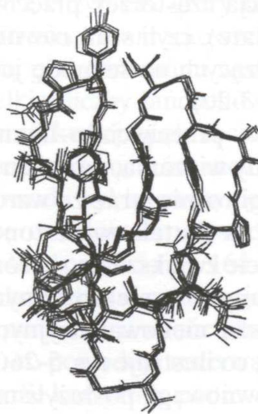


SPEKTROSKOPIA NMR

Spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR), stosowaną w przeszłości do analizy struktury małych cząsteczek, obecnie coraz częściej wykorzystuje się do badania struktury małych białek lub domen białek. Technika ta wymaga tylko małej objętości stężonego roztworu oczyszczonego białka.

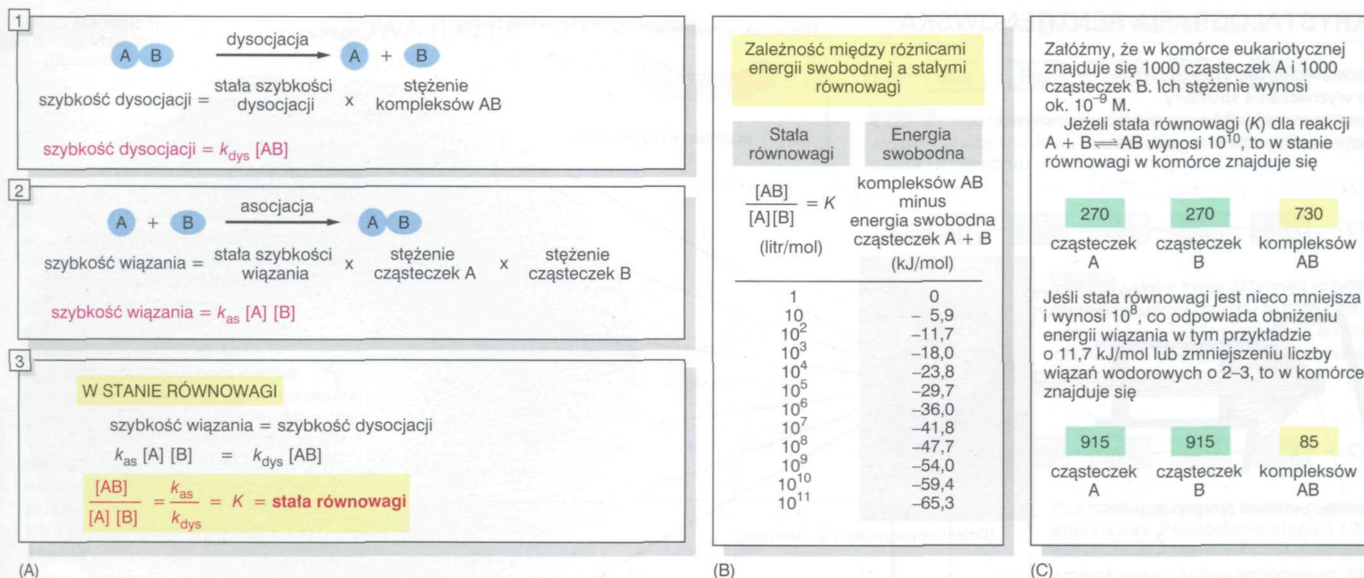
Roztwór ten umieszcza się w silnym polu magnetycznym i poddaje promieniowaniu elektromagnetycznemu o częstotliwości fal radiowych. Możliwość identyfikacji sygnałów z jąder wodoru w różnych aminokwasach pozwala zmierzyć odległości między oddziałującymi parami atomów wodoru. NMR dostarcza informacji o odległości między częściami cząsteczki białka. Połączenie tych informacji z danymi na temat sekwencji aminokwasowej umożliwia wyznaczenie struktury przestrzennej tego białka. Spektroskopia NMR pozwala wyznaczyć strukturę tylko małych białek (do 20 kDa)





(A) (Dzięki uprzejmości: P. Kraulis) (B)

(A) Dwuwymiarowe widmo NMR domeny zlokalizowanej na końcu karboksylowym enzymu celulazy. Widoczne plamki przedstawiają oddziaływania między sąsiadującymi atomami wodoru. (B) Możliwe struktury spełniające wymogi wyznaczonych odległości.



Rys. 5-26. Związek między energiami wiązania i stałą równowagi. (A) Równowaga między cząsteczkami A i B a kompleksem AB jest następstwem utrzymania w równowadze dwóch przeciwstawnych reakcji, (1) i (2). Aby reagować, cząsteczki A i B muszą się zderzać, dlatego też szybkość reakcji (2) jest proporcjonalna do iloczynu ich stężeń [A]·[B], gdzie [ ] oznacza stężenie. Jak przedstawiono w (3), stosunek stałych szybkości reakcji asocjacji (wiązania) i dysocjacji jest równy stałej równowagi (*K*) reakcji. (B) Stała równowagi w (3) dotyczy reakcji A + B ⇄ AB; im większa jest jej wartość, tym silniejsze jest wiązanie między A i B. Stała równowagi zmienia się o rząd wielkości (dziesięciokrotnie) przy różnicy energii swobodnej 5,9 kJ/mol (patrz także tab. 3-1, s. 92). (C) Przykład ilustrujący zasadniczy wpływ obecności lub braku kilku słabych wiązań w sytuacji biologicznej

Siłę wiązania można oszacować na podstawie stałej równowagi

Różne przeciwciała wiążą się ze swoimi ligandami z różną siłą, którą można zmierzyć bezpośrednio. Wyobraźmy sobie na przykład sytuację, w której populacja identycznych cząsteczek przeciwciała napotyka nagle populację ligandów dyfundujących w otaczającym je roztworze. W krótkich odstępach czasu cząsteczki liganda będą zderzać się z miejscem wiążącym przeciwciała, co doprowadzi do powstania kompleksu przeciwciało–ligand. Populacja kompleksów przeciwciało–ligand będzie więc powiększać się, ale tylko do pewnego stopnia: wraz z upływem czasu wzrośnie znaczenie drugiego procesu, polegającego na rozpadzie powstałych kompleksów na skutek termicznie indukowanego ruchu. Ostatecznie populacja cząsteczek przeciwciała i liganda osiągnie stan ustalony (ang. steady state), czyli **stan równowagi**, w którym liczba asocjacji (połączeń) zachodzących na sekundę jest dokładnie równa liczbie dysocjacji (patrz także rys. 3-20).

Stężenia liganda, przeciwciała i kompleksów przeciwciało–ligand w stanie równowagi dostarczają dogodnej miary siły wiązania, nazywanej **stałą równowagi (*K*)** (rys. 5-26). Stała równowagi rośnie wraz ze wzrostem siły wiązania między dwiema cząsteczkami (na skutek zwiększonej liczby wiązań niekowalencyjnych), co stanowi odbicie zwiększania się różnicy energii swobodnej między stanem związanym i niezwiązanym (rys. 5-26B). Nawet zmiana dotycząca kilku wiązań niekowalencyjnych może mieć zasadniczy wpływ na przebieg wiązania, co ilustruje rys. 5-26C.

Aby przedstawić wpływ siły wiązania na stan równowagi, posłużyliśmy się przykładem wiązania przeciwciała z ligandem, ale te same zasady można zastosować w przypadku dowolnego białka i jego liganda. Wiele białek

enzymatycznych najpierw wiąże się z ligandami, a następnie katalizuje rozpad lub tworzenie wiązań kowalencyjnych w tych cząsteczkach, czym się obecnie zajmiemy.

Enzymy są silnymi i bardzo specyficznymi katalizatorami

Wiele białek potrafi tylko wiązać inne cząsteczki. Cząsteczka przeciwciała spełnia całkowicie swą funkcję, gdy po prostu zwiąże się z celem, na który jest nastawiona, bakterią lub wirusem; cząsteczce aktyny wystarczy jedynie związanie się z inną cząsteczką aktyny, aby stworzyć filament. Istnieją jednak inne białka, dla których związanie liganda jest tylko pierwszym niezbędnym etapem ich funkcji. To właśnie zachodzi w przypadku dużej i bardzo ważnej klasy białek o nazwie **enzymy**. Jak opisano już w rozdz. 3, enzymy są szczególnymi cząsteczkami, które determinują wszystkie chemiczne przekształcenia zachodzące w komórkach. Wiążą one jeden lub więcej ligandów, nazywanych **substratami** i zamieniają je w zmodyfikowane chemicznie *produkty*, powtarzając tę czynność wielokrotnie i bardzo szybko. Enzymy przyspieszają reakcje, często milion razy, przy czym same nie ulegają zmianie — tj. działają jak *katalizatory*, które pozwalają komórce tworzyć lub rozrywać wiązania kowalencyjne, według aktualnej potrzeby. To właśnie katalizowanie przez enzymy zorganizowanych układów reakcji chemicznych tworzy i podtrzymuje komórkę, umożliwiając życie.

Enzymy dzieli się według czynności na klasy, prowadzące podobne reakcje chemiczne (tab. 5-2). Każdy rodzaj enzymu jest bardzo specyficzny, katalizując tylko jeden typ reakcji. Na przykład *heksokinaza* dodaje grupę fosforanową do D-glukozy, ale ignoruje jej izomer optyczny, L-glukozę; uczestnicząca w krzepnięciu krwi *trombina* rozcina jeden typ białek osocza pomiędzy określoną argininą a sąsiednią glicyną, nie ruszając innych wiązań, i tak dalej. Jak omówiono to szczegółowo w rozdz. 3 i 4, enzymy pracują w zespołach, a produkt jednego enzymu staje się substratem dla następnego. Wynikiem takiego działania jest skomplikowana sieć szlaków metabolicznych dostarczająca komórce energii i wytwarzająca liczne wielkie i małe cząsteczki potrzebne komórce (patrz rys. 3-2).

Pytanie 5-5. Białko A wiąże się z białkiem B, co prowadzi do powstania kompleksu AB. Komórka zawiera równowagową mieszaninę białka A w stężeniu 1 μM, białka B w stężeniu 1 μM i mieszaniny AB (powstającej w wyniku wiązania A z B) także w stężeniu 1 μM.

A. Na podstawie rys. 5-26 oblicz stałą równowagi dla reakcji A + B ⇄ AB.
B. Ile będzie wynosić stała równowagi, jeśli A, B i AB będą się znajdować w stanie równowagi przy dużo mniejszym stężeniu, tj. 1nM każdy?
C. Ile dodatkowych wiązań wodorowych musi powstać, aby A i B w mniejszym stężeniu (1nM) po związaniu ze sobą występowały w kompleksie AB w podobnych ilościach? (Każde wiązanie wodorowe dostarcza ok. 4,184 kJ/mol).

Pytanie 5-6. Wyjaśnij, w jaki sposób enzym (taki jak heksokinaza wspomniana w tekście) może odróżniać substraty (D-glukozę) od ich optycznych izomerów (L-glukozy). (Wskazówka: pamiętając, że atom węgla tworzy cztery pojedyncze wiązania ułożone tetraedrycznie oraz że w izomerach optycznych wiązania te stanowią swe lustrzane odbicia, narysuj substrat w postaci prostego czworościanu z czterema różnymi atomami na wierzchołkach, następnie narysuj jego lustrzane odbicie. Wykorzystując ten rysunek wyjaśnij, dlaczego tylko jeden z narysowanych związków może być wiązany przez schematycznie przedstawione miejsce aktywne enzymu).

Lizozym ilustruje pracę enzymu

Aby wyjaśnić, jak enzymy katalizują reakcje chemiczne, zastosujemy przykład enzymu działającego jako naturalny antybiotyk w białku jaja kurzego, ślinie, łzach i innych wydzielinach. Lizozym jest enzymem, który katalizuje rozcinanie łańcuchów polisacharydowych w ścianach komórkowych bakterii. Ponieważ komórka bakteryjna znajduje się pod ciśnieniem wywołanym siłami osmotycznymi, rozcięcie nawet niewielkiej liczby łańcuchów polisacharydowych powoduje rozerwanie ściany komórkowej i pęknięcie komórki. Lizozym jest stosunkowo małym i stabilnym białkiem, które można łatwo wyizolować w dużych ilościach. Z tego też powodu był intensywnie badany i stanowił pierwszy enzym, którego strukturę opracowano do szczegółów atomowych stosując krystalografię rentgenowską (panel 5-6, s. 164–165).

Reakcja katalizowana przez lizozym jest rekcją hydrolizy; do pojedynczego wiązania pomiędzy dwiema sąsiednimi grupami cukru w łańcuchu polisacharydowym dodana zostaje cząsteczka wody, co powoduje rozerwanie wiązania (patrz rys. 3-32). Reakcja jest energetycznie korzystna, ponieważ energia swobodna rozciętego łańcucha polisacharydowego jest niższa od energii swobodnej łańcucha nienaruszonego. Jednakże czysty polisacharyd mógłby

Tabela 5-2. Pewne podstawowe typy enzymów

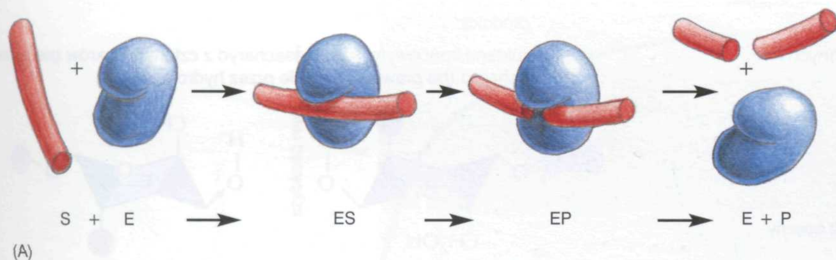
ENZYM	KATALIZOWANE REAKCJE
HYDROLAZY	Ogólna nazwa enzymów katalizujących hydrolityczną reakcję rozpadu
NUKLEAZY	Rozkład kwasów nukleinowych przez hydrolizę wiązań między nukleotydami
PROTEAZY	Rozkład białek przez hydrolizę wiązań między aminokwasami
SYNTAZY*	Ogólna nazwa enzymów, które w procesach anabolicznych syntetyzują cząsteczki przez kondensację dwóch mniejszych cząsteczek
IZOMERAZY	Katalizują przekształcenie wiązań w obrębie pojedynczej cząsteczki
POLIMERAZY	Katalizują reakcje polimeryzacji, takie jak synteza DNA i RNA
KINAZY	Katalizują przyłączanie grup fosforanowych do cząsteczek. Kinazy białkowe są ważnym podtypem kinaz dołączających grupy fosforanowe do białek
FOSFATAZY	Katalizują hydrolityczne usuwanie grupy fosforanowej z cząsteczki
OKSYDOREDUKTAZY	Ogólna nazwa enzymów katalizujących reakcje, w których jedna cząsteczka jest utleniana, a druga równocześnie redukowana. Enzymy tego typu określa się często jako *oksydazy*, *reduktazy* i *dehydrogenazy*
ATPAZY	Hydrolizują ATP. Aktywność ATPazowa zużytkowująca energię jest częścią funkcji wielu białek o rozmaitym działaniu, jak białka motoryczne, np. *miozyna,* i białka prowadzące transport przez błonę, np. *pompa sodowo-potasowa*

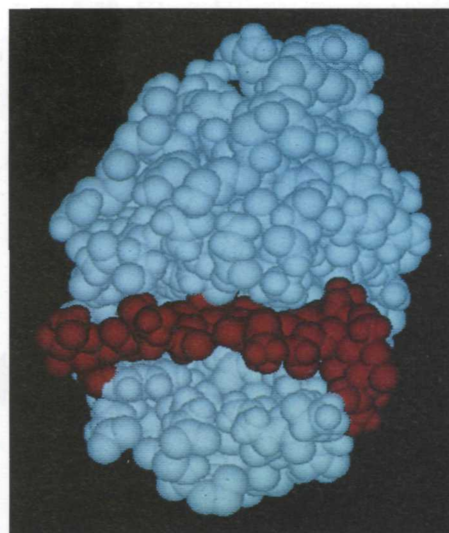
Nazwy enzymów mają zazwyczaj końcówkę -aza, ale istnieje wiele wyjątków, jak: pepsyna, trypsyna, trombina, lizozym itd., które odkryto i nazwano, zanim przyjęto tę konwencję nomenklatury (w końcu XIX wieku). Nazwa potoczna enzymu zazwyczaj wskazuje na substrat i charakter katalizowanej reakcji. Na przykład syntaza cytrynianowa katalizuję syntezę cytrynianu przez przyłączenie acetylo-CoA do szczawiooctanu.

* Enzymy wymagające sprzężenia syntezy z hydrolizą ATP to syn**te**tazy (*przyp. tłum.*).

latami pozostawać w wodzie nie ulegając hydrolizie w wykrywalnym stopniu. Powodem tego jest energetyczna bariera reakcji omówiona w rozdz. 3 (patrz rys. 3-12). Aby wchodząca w kolizję cząsteczka wody mogła rozerwać wiązanie między dwoma cukrami, cząsteczka polisacharydu musi ulec odkształceniu do szczególnego kształtu — **stanu przejściowego**, w którym atomy wokół wiązania uzyskują zmienioną geometrię i rozmieszczenie elektronów. Wywołanie tego odkształcenia wymaga przed zajściem reakcji znacznego dopływu energii, nazywanej *energią aktywacji*, której źródłem są przypadkowe zderzenia. W roztworze wodnym i pokojowej temperaturze energia zderzeń prawie nigdy nie przekracza energii aktywacji, wskutek czego hydroliza, jeśli w ogóle zachodzi, to odbywa się niezwykle wolno.

W tym właśnie momencie wkracza enzym. Jak wszystkie enzymy, lizozym ma na powierzchni specjalne miejsce wiążące, o nazwie **miejsce aktywne**, które precyzyjnie pasuje do obrysu cząsteczki jego substratu i w którym zachodzi kataliza reakcji chemicznej. Ponieważ substratem jest polimer, miejsce aktywne lizozymu stanowi długi rowek który przytrzymuje równocześnie sześć związanych cukrów. Gdy tylko polisacharyd zostanie związany tworząc kompleks enzym–substrat, enzym tnie polisacharyd dodając cząsteczkę wody do jednego z wiązań pomiędzy cukrami. Łańcuchy stanowiące produkt reakcji zostają szybko oddzielone, uwalniając enzym do następnych cykli reakcji (rys. 5-27).





Rys. 5-27. Szkic reakcji katalizowanych przez lizozym. (A) Schematyczny wygląd lizozymu (*niebieski*), enzymu który katalizuje rozcinanie łańcucha polisacharydowego, będącego jego substratem (*czerwony*). Początkowo enzym wiąże się z łańcuchem wytwarzając kompleks enzym–substrat (ES) a następnie katalizuje rozcięcie specyficznego wiązania kowalencyjnego w łańcuchu polisacharydu, tworząc kompleks enzym–produkt (EP), który szybko dysocjuje. Uwolnienie rozciętego łańcucha (produkty P) uwalnia enzym do działania z następną cząsteczką substratu. (B) Model czaszowy cząsteczki lizozymu związanego z krótkim łańcuchem polisacharydowym, jeszcze przed rozcięciem. (B dzięki uprzejmości: Richard J. Feldmann)

Mechanizm chemiczny umożliwiający wiązanie lizozymu do jego substratu jest taki sam jak w przypadku wiązania przeciwciała — a więc polega na powstawaniu wielu wiązań niekowalencyjnych. Jednakże lizozym przytrzymuje swój polisacharydowy substrat w szczególny sposób, tak iż jeden z dwóch cukrów, pomiędzy którymi występuje atakowane wiązanie, odkształca się względem swej normalnej, najbardziej stabilnej konformacji. Atakowane wiązanie zostaje równocześnie przytrzymane w obrębie miejsca aktywnego blisko dwóch aminokwasów o kwaśnych łańcuchach bocznych: kwasu glutaminowego i asparaginowego.

W ten sposób w mikrootoczeniu aktywnego miejsca lizozymu tworzą się warunki, które znacznie zmniejszają energię aktywacji niezbędną do przebiegu hydrolizy. Rysunek 5-28 przedstawia etapy tej reakcji katalizowanej enzymatycznie. W fazie początkowej enzym napina związaną cząsteczkę substratu uginając pewne krytyczne wiązania chemiczne, które będą brały udział w reakcji chemicznej, tak iż kształt substratu staje się podobny do kształtu stanu przejściowego o wysokiej energii, który tworzy się w połowie drogi reakcji. Następnie kwaśny łańcuch boczny kwasu glutaminowego, precyzyjnie ustawiony w obrębie miejsca aktywnego, przyspiesza hydrolizę wytwarzając duże stężenie zakwaszających jonów H^+, mimo że płyn otaczający enzym ma pH obojętne. W końcu reszta kwasu asparaginowego o ujemnym ładunku jeszcze bardziej stabilizuje dodatnio naładowany stan przejściowy. W wyniku tych częściowych procesów całkowity przebieg reakcji chemicznej, począwszy od związania polisacharydu na powierzchni enzymu aż do końcowego uwolnienia rozciętych łańcuchów przebiega wiele milionów razy szybciej, aniżeli działoby się to w nieobecności enzymu.

Podobne mechanizmy są wykorzystywane przez inne enzymy, aby obniżyć energię aktywacji i przyspieszyć katalizowane reakcje. W reakcjach obejmujących dwa lub więcej substratów miejsce aktywne działa jak matryca lub foremka, która zestawia substraty w orientacji umożliwiającej im reagowanie ze sobą (rys. 5-29A). Jak widzieliśmy w przypadku lizozymu, miejsce aktywne enzymu zawiera precyzyjnie ustawione atomy, które przyspieszają reakcję za pomocą grup naładowanych elektrycznie zmieniając rozmieszczenie elektronów w substratach (rys. 5-29B). Widzieliśmy również, że związanie do enzymu zmienia też kształt substratu, uginając wiązania tak, aby ułatwić substratowi wejście w określony stan przejściowy (rys. 5-29C). Na koniec wiele enzymów bierze bardzo ścisły udział w reakcji, tworząc krótkotrwałe wiązanie kowalencyjne między substratem a aminokwasową resztą enzymu. Kolejne etapy reakcji przywracają bocznej grupie enzymu jej stan wyjściowy tak, że enzym po ukończeniu reakcji pozostaje niezmieniony (patrz rys. 4-5).

Miarą działania enzymu są wartości V_{max} i K_M

Aby przeprowadzić katalizę reakcji, enzym musi związać swój substrat. Następnie substraty ulegają reakcji przechodząc w cząsteczki produktu,

substrat

Substrat ten jest oligosacharydem z sześciu cukrów, oznaczonych A–F. Pokazano strukturę cukrów D i E

łańcuch boczny cukru

produkty

Produktami końcowymi są oligosacharyd z czterech cukrów (*po lewej*) i disacharyd (*po prawej*) powstałe przez hydrolizę

W kompleksie enzym–substrat (ES), enzym wymusza przejście cukru D w konformację napiętą, przy czym Glu 35 ustawiony jest tak, aby służyć jako kwas, który atakuje sąsiednie wiązanie cukier–cukier przez dostarczenie protonu (H^+)

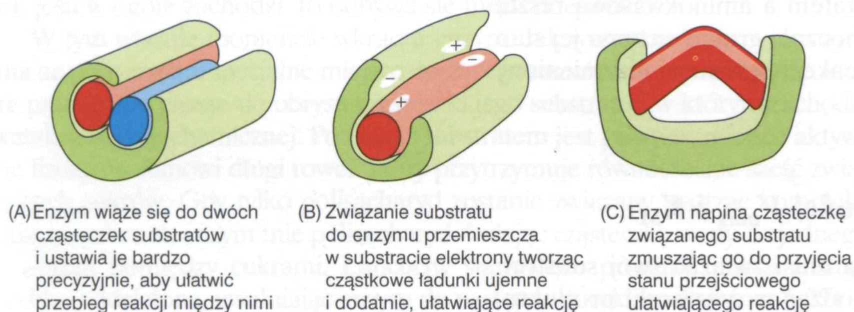
Nietrwały stan przejściowy z dodatnim ładunkiem na cukrze D. Zarówno napięcie przy cukrze D, jak i pobliski ujemny ładunek Asp 52 stabilizują ten intermediat, znacznie obniżając jego energię na powierzchni enzymu

Szybkie dodanie cząsteczki wody (kolor zielony) kończy hydrolizę i regeneruje uprotonowaną formę Glu 35, tworząc kompleks enzym–produkt (EP)

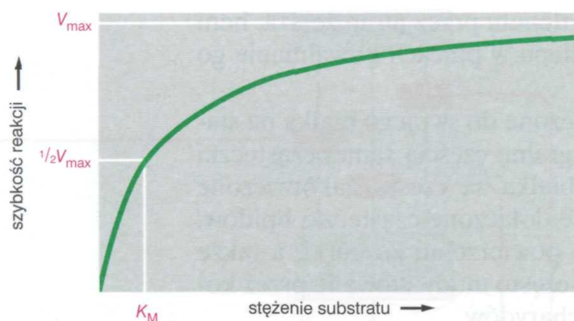
Rys. 5-28. Procesy przebiegające w miejscu aktywnym lizozymu. W lewym i prawym rogu *górnym* przedstawiono wolny substrat i wolne produkty, na pozostałych trzech częściach rysunku — sekwencję zdarzeń w miejscu aktywnym enzymu. Należy zwrócić uwagę na zmianę konformacji cukru D w kompleksie enzym–substrat; to ten właśnie cukier uzyskuje ładunek dodatni w nietrwałym stanie przejściowym

które początkowo pozostają związane z enzymem, a dopiero później produkt zostaje uwolniony i oddyfundowuje, pozwalając, by uwolniony enzym związał następną cząsteczkę substratu i katalizował następną reakcję (patrz rys. 5-27A). Szybkości przebiegu tych poszczególnych etapów są bardzo różne dla różnych enzymów; można je mierzyć, umieszczając w odpowiednim płynie oczyszczone enzymy wraz z ich substratami i przestrzegając ściśle określonych warunków.

Jeśli stężenie substratu będzie stopniowo zwiększane począwszy od bardzo małej wartości, to stężenie kompleksu enzym–substrat i stąd szybkość, z jaką powstaje produkt, będzie początkowo wzrastać w sposób liniowy w prostej proporcji do stężenia substratu. Jednakże w miarę jak coraz więcej cząsteczek enzymu zostanie związanych przez substrat, szybkość ta będzie się zmniejszać aż — przy bardzo dużym stężeniu substratu — osiągnie wartość maksymalną, określaną jako V_{max}. W tym momencie miejsca aktywne wszystkich cząsteczek enzymu w próbce zostały całkowicie zajęte przez substrat



Rys. 5-29. Pewne ogólne cechy katalizy enzymatycznej. (A) Utrzymanie substratów razem w precyzyjnym ustawieniu. (B) Stabilizacja intermediatów reakcji przez ładunki. (C) Zmiana kąta wiązania w substracie w celu zwiększenia szybkości danej reakcji



Rys. 5-30. Kinetyka enzymu. Szybkość reakcji enzymatycznej (V) wzrasta ze wzrostem stężenia substratu aż do osiągnięcia szybkości maksymalnej (V_{max}). Jest to sytuacja, w której wszystkie miejsca wiążące substrat na cząsteczkach enzymu są całkowicie zajęte, a szybkość reakcji jest ograniczana przez szybkość procesu katalitycznego na powierzchni enzymu. Dla większości enzymów stężenie substratu zapewniające szybkość reakcji równą połowie szybkości maksymalnej (K_M) jest bezpośrednią miarą ścisłości związania substratu, przy czym duża wartość K_M odpowiada słabemu wiązaniu

i szybkość tworzenia produktu zależy już tylko od tego, jak szybko cząsteczka substratu może ulegać przemianie. Dla wielu enzymów szybkość ta, zwana **liczbą obrotów**, jest rzędu 1000 cząsteczek substratu na sekundę, aczkolwiek znane są też liczby obrotów od 1 do 10 000.

Stężenie substratu niezbędne do efektywnej pracy enzymu mierzy się często innym parametrem — wartością K_M, która odpowiada takiemu stężeniu substratu, przy którym enzym pracuje z połową szybkości maksymalnej (0,5 V_{max}) (rys. 5-30). Ogólnie biorąc, mała wartość K_M wskazuje, że substrat wiąże się z enzymem bardzo ściśle, a duża wartość wskazuje na słabe wiązanie.

Pytanie 5-7. Krzywą przedstawioną na rys. 5-30 można opisać za pomocą prostego równania:

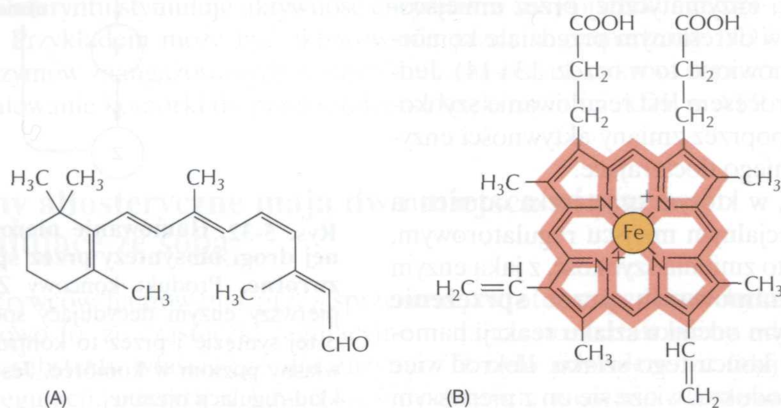
szybkość = V_{max} [S/ (S + K_M)]

Równanie to nazywane jest równaniem Michaelisa–Menten dla upamiętnienia naukowców, którzy użyli go po raz pierwszy do opisu reakcji enzymatycznych. Czy można stwierdzić z przekonaniem, że właściwości jakościowo opisane w tekście są dokładnie opisane przez to równanie? W szczególności, w jaki sposób można uprościć powyższe równanie, gdy stężenie substratu mieści się w jednym z następujących zakresów: A) stężenie substratu S jest dużo mniejsze niż K_M, B) stężenie substratu jest równe K_M i C) stężenie substratu jest dużo większe niż K_M?

Ścisłe związanie małych cząsteczek nadaje białkom dodatkowe funkcje

Aczkolwiek podkreślaliśmy wszechstronność białek, jako łańcuchów aminokwasów, w pełnieniu różnych funkcji, w wielu przypadkach same aminokwasy do tej różnorodności nie wystarczą. Jak człowiek używa narzędzi, aby wzmocnić i rozszerzyć zdolność swoich rąk, tak białka wykorzystują często małe niebiałkowe cząsteczki, aby pełnić funkcje, które byłyby trudne lub wręcz niemożliwe do wykonania z udziałem samych aminokwasów. Tak więc białkowy receptor sygnałów *rodopsyna* — purpurowy barwnik wrażliwy na światło, wytwarzany przez komórki pręcikowe siatkówki — wykrywa światło za pomocą małej cząsteczki *retinalu* umieszczonej w głębi cząsteczki białka (rys. 5-31A). Retinal po zaabsorbowaniu fotonu światła zmienia swój kształt, a zmiana ta zostaje wzmocniona przez białko, zapoczątkowując kaskadę reakcji enzymatycznych, które w końcowym efekcie wywołują sygnał elektryczny przenoszony do mózgu.

Innym przykładem białka, które ma część niebiałkową, jest hemoglobina (patrz rys. 5-16). Cząsteczka hemoglobiny zawiera 4 grupy hemowe — pierścieniowe cząsteczki *hemu*, z których każda ma centralnie umieszczony atom żelaza (rys. 5-31B). Hem nadaje hemoglobinie (i krwi) czerwony



Rys. 5-31. Retinal i hem. (A) Budowa retinalu, cząsteczki światłoczułej złączonej w siatkówce naszych oczu z rodopsyną. (B) Budowa grupy hemowej, w której pierścień hemu, zawierający azot, oznaczono kolorem *czerwonym*, a atom żelaza w jej środku — kolorem *pomarańczowym*. Grupa hemowa jest ściśle związana z każdym z czterech polipeptydowych łańcuchów hemoglobiny, białka przenoszącego tlen. Strukturę hemoglobiny pokazano na rys. 5-16

kolor. Wiążąc się odwracalnie z gazowym tlenem przez atom żelaza, hem umożliwia hemoglobinie wychwytywanie tlenu w płucach i uwalnianie go w tkankach.

Czasami te drobne cząsteczki są przyłączone do swojego białka na stałe, kowalencyjnie, stając się przez to integralną częścią samej cząsteczki białka. W rozdziale 11 zobaczymy, że białka są często zakotwiczone w błonie komórkowej przez kowalencyjnie dołączone cząsteczki lipidów. Z kolei białka błonowe eksponowane na powierzchni komórki, a także białka wydzielane poza obręb komórki, są często modyfikowane przez kowalencyjne przyłączenie cukrów i oligosacharydów.

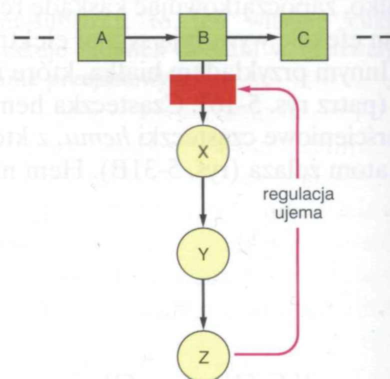
W miejscach aktywnych wielu enzymów często związane są małe cząsteczki lub atomy metali, które wspierają ich katalityczne funkcje. Na przykład *karboksypeptydaza*, enzym rozcinający łańcuchy polipeptydowe, zawiera w centrum aktywnym ściśle związany jon cynku. Podczas rozcinania wiązania peptydowego przez karboksypeptydazę jon cynku tworzy przejściowe wiązanie z jednym z atomów substratu, wspomagając przez to reakcję hydrolizy. W innych enzymach podobnemu celowi służy mała cząsteczka organiczna, np. *biotyna* występująca w enzymach, które przenoszą grupę karboksylową (—COO^-) z jednej cząsteczki na drugą (patrz rys. 3-31). Biotyna bierze udział w tych reakcjach tworząc przejściowo wiązanie kowalencyjne z przenoszoną grupą —COO^- i jest do tej funkcji lepiej przystosowana niż jakikolwiek z aminokwasów budujących białka. Ponieważ nasz organizm nie może syntetyzować biotyny, jest ona *witaminą*, która musi być dostarczana w małych ilościach z pokarmem. Podobnie inne witaminy potrzebne są do wytworzenia małych cząsteczek będących istotnymi składnikami naszych białek: np. w pokarmach niezbędna jest witamina A, potrzebna do wytworzenia retinalu, wrażliwej na światło części rodopsyny.

Katalityczne funkcje enzymów podlegają regulacji

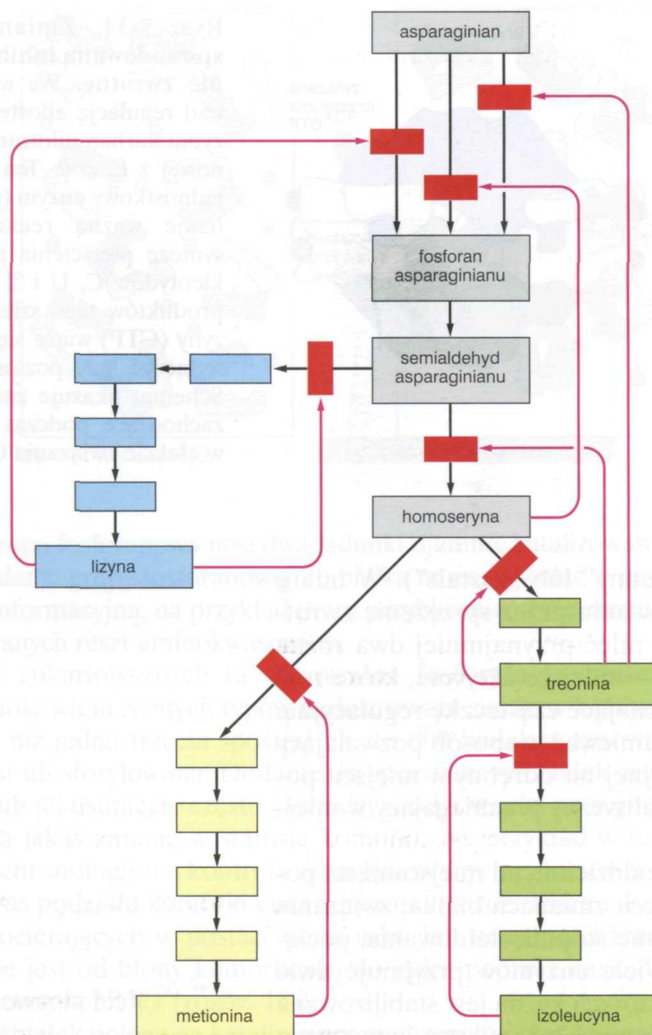
Żywa komórka zawiera tysiące enzymów, z których wiele działa równocześnie w tej samej małej objętości cytozolu. Przez swą działalność katalityczną enzymy tworzą skomplikowaną sieć dróg metabolicznych, a każda z nich jest złożona z łańcuchów reakcji chemicznych, w których produkt jednego enzymu staje się substratem dla następnego. W tym labiryncie dróg istnieje wiele punktów rozgałęzień, w których różne enzymy współzawodniczą o ten sam substrat. Cały system jest tak złożony (patrz rys. 3-2), że niezbędna jest skrupulatna kontrola pozwalająca regulować szybkość i moment włączenia się każdej reakcji.

Regulacje występują na wielu poziomach. Jeden z nich to kontrolowanie ilości cząsteczek wytwarzanych przez enzym odbywające się poprzez regulację ekspresji genu kodującego ten enzym (omówiono to w rozdz. 8). Inny poziom dotyczy kontroli aktywności enzymatycznej przez umiejscowienie grup współpracujących enzymów w określonym przedziale komórkowym otoczonym specyficzną błoną (omówiono to w rozdz. 13 i 14). Jednak najszybszym i najbardziej ogólnym procesem jest regulowanie szybkości reakcji na poziomie samego enzymu poprzez zmiany aktywności enzymu w odpowiedzi na inne cząsteczki do niego docierające.

Najczęstszym typem kontroli jest ten, w którym cząsteczka odmienna od substratu wiąże się do enzymu w specjalnym miejscu regulatorowym, odrębnym od miejsca aktywnego, i przez to zmienia szybkość, z jaką enzym przekształca substrat w produkt. W **hamowaniu przez sprzężenie zwrotne** enzym działający na początkowym odcinku szlaku reakcji hamowany jest przez produkt powstający przy końcu tego szlaku. Ilekroć więc rozpocznie się akumulacja końcowego produktu, wiąże się on z pierwszym



Rys. 5-32. Hamowanie nierozgałęzionej drogi biosyntezy przez sprzężenie zwrotne. Produkt końcowy Z hamuje pierwszy enzym decydujący specyficznie o tej syntezie i przez to kontroluje swój własny poziom w komórce. Jest to przykład regulacji ujemnej



Rys. 5-33. Wielokrotne hamowanie przez sprzężenie zwrotne. W przykładzie pokazującym szlaki biosyntezy czterech różnych aminokwasów u bakterii, *czerwonymi strzałkami* zaznaczono miejsca, w których produkty hamują zwrotnie enzymy. Każdy aminokwas reguluje pierwszy enzym specyficzny dla jego własnej syntezy, kontrolując przez to swój własny poziom i unikając niepotrzebnego nagromadzania intermediatów. Produkty mogą również oddzielnie hamować początkowe zestawy reakcji wspólne dla wszystkich syntez; w tym przypadku trzy różne enzymy katalizują reakcję zapoczątkowującą, a każdy z nich jest hamowany przez inny produkt

enzymem szlaku i opóźnia jego działanie katalityczne, ograniczając przez to dojście substratów do dalszej części szlaku reakcji (rys. 5-32). W miejscu rozgałęziania lub przecinania się dróg metabolicznych występuje wiele punktów kontroli dokonywanej przez różne produkty końcowe, z których każdy zapewnia regulację swej własnej syntezy (rys. 5-33). Inhibicja przez sprzężenie zwrotne jest *regulacją ujemną*; zapobiega działaniu enzymu. Enzym może także podlegać *regulacji dodatniej*, w której aktywność enzymu jest przez cząsteczkę regulatorową stymulowana, a nie hamowana. Regulacja dodatnia występuje wtedy, gdy produkt jednej gałęzi metabolicznego labiryntu stymuluje aktywność enzymów w innym szlaku metabolicznym. Przykładem może być aktywowanie przez nagromadzony ADP kilku enzymów zaangażowanych w utlenianiu cząsteczek cukrów, a przez to stymulowanie komórki do przekształcenia większej ilości ADP w ATP.

Pytanie 5-8. Rozważmy schemat przedstawiony na rys. 5-32. Co się stanie, gdy zamiast wskazanego sprzężenia

A. hamowanie na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez Z odbywa się tylko na etapie B → C?

B. hamowanie na zasadzie sprzężenia zwrotnego przez Z odbywa się tylko na etapie Y → Z?

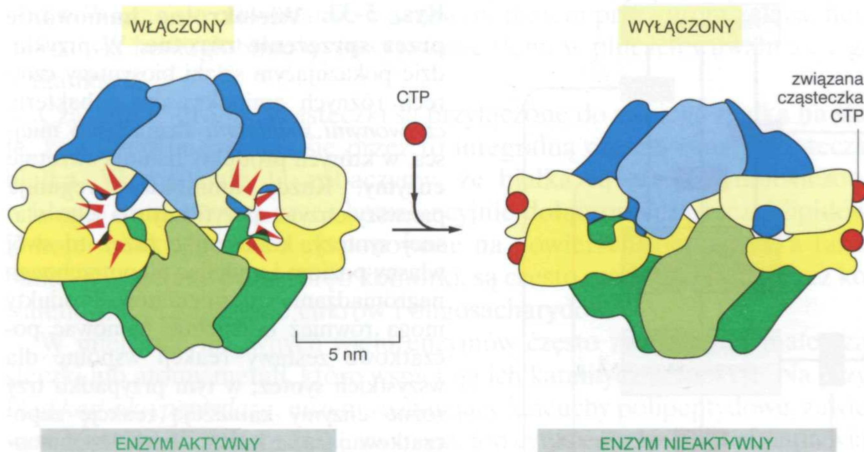
C. Z stymuluje etap B → X?

D. Z stymuluje etap B → C?

Przedyskutuj użyteczność powyższych schematów regulacyjnych dla komórki.

Enzymy allosteryczne mają dwa miejsca wiążące oddziałujące ze sobą

Dla odkrywców hamowania przez sprzężenie zwrotne zagadkowe było początkowo to, że cząsteczki regulacyjne mają często kształt różny od kształtu substratu właściwego dla enzymu. To było powodem, że taką formę regulacji, odkrytą w latach sześćdziesiątych, nazwano *allosterią*



Rys. 5-34. Zmiana konformacyjna spowodowana inhibicją przez sprzężenie zwrotne. We wczesnych badaniach nad regulacją allosteryczną używano enzymu karbamoilotransferazy asparaginianowej z *E. coli.* Ten ogromny wielopodjednostkowy enzym (patrz rys. 5-17) katalizuje ważną reakcję rozpoczynającą syntezę pierścienia pirymidynowego nukleotydów C, U i T. Jeden z końcowych produktów tego szlaku, trifosforan cytozyny (CTP) wiąże się z enzymem, aby go wyłączyć, gdy poziom CTP jest wysoki. Schemat ukazuje zmiany konformacyjne zachodzące podczas wyłączenia enzymu w efekcie związania CTP

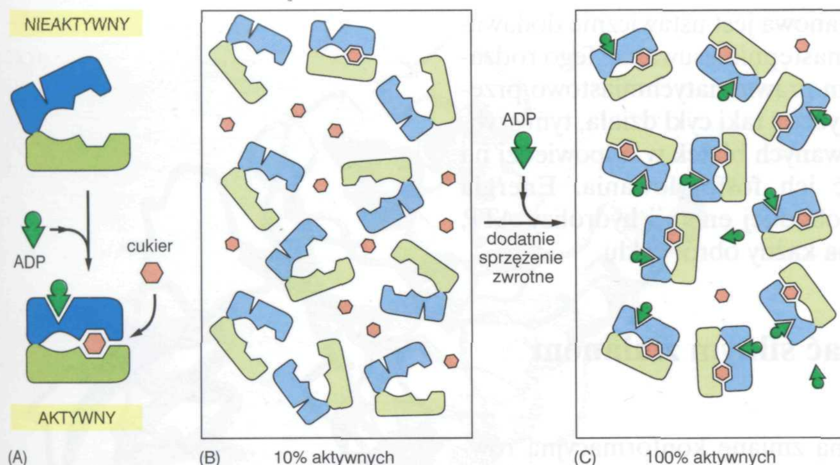
(grec. allo — „inny", stere — „przestrzenny" lub „kształt"). W miarę zdobywania nowych wiadomości o hamowaniu przez sprzężenie zwrotne zrozumiano, że wiele enzymów musi mieć przynajmniej dwa różne miejsca wiązania na swojej powierzchni — miejsce aktywne, które rozpoznaje substrat, i drugie miejsce, rozpoznające cząsteczkę regulacyjną. Te dwa miejsca muszą się ze sobą porozumiewać w sposób pozwalający na to, aby związanie cząsteczki regulacyjnej na odrębnym miejscu powierzchni białka wpływało na proces katalityczny przebiegający w miejscu aktywnym.

Dziś wiemy, że oddziaływanie między oddzielonymi miejscami na powierzchni białka polega na *konformacyjnych* zmianach białka; związanie w jednym miejscu powoduje drobną zmianę stopnia sfałdowania, pociągając za sobą zmianę kształtu białka. Wiele enzymów przyjmuje dwie konformacje różniące się aktywnością, z których każda jest stabilizowana przez wiązanie odmiennych ligandów. Na przykład podczas hamowania przez sprzężenie zwrotne, związanie inhibitora do jednego miejsca białka powoduje w białku taką zmianę konformacji, w wyniku której miejsce aktywne — umieszczone w innym miejscu białka — jest unieczynnione (rys. 5-34).

Wiele — o ile nie większość — cząsteczek białek ma właściwości **allosteryczne**; mogą one przyjmować dwie lub więcej nieco różniących się konformacji, a podczas przejścia z jednej konformacji do drugiej ich aktywność może ulec zmianie. Dotyczy to nie tylko enzymów, lecz także wielu innych białek wraz z receptorami, białkami strukturalnymi i białkami o funkcjach motorycznych. Ponieważ każda konformacja odznacza się nieco innym obrysem powierzchni cząsteczki, miejsce wiążące dla jednego lub więcej ligandów może łatwo ulec zmianie. Poszczególny ligand oddziałuje najchętniej z tą konformacją, z którą wiąże się najsilniej, i występując w dostatecznie dużym stężeniu może „przełączyć" białko z jednej konformacji w drugą (rys. 5-35).

Powodem zmiany konformacyjnej może być ufosforylowanie białka

Stwierdziliśmy, że wiele białek allosterycznych jest regulowane przez związanie małej cząsteczki. Drugą metodą powszechnie stosowaną przez komórki eukariotyczne w celu regulowania funkcji białka jest kowalencyjne dołączenie grupy fosforanowej do jednej z jego bocznych reszt aminokwasowych.

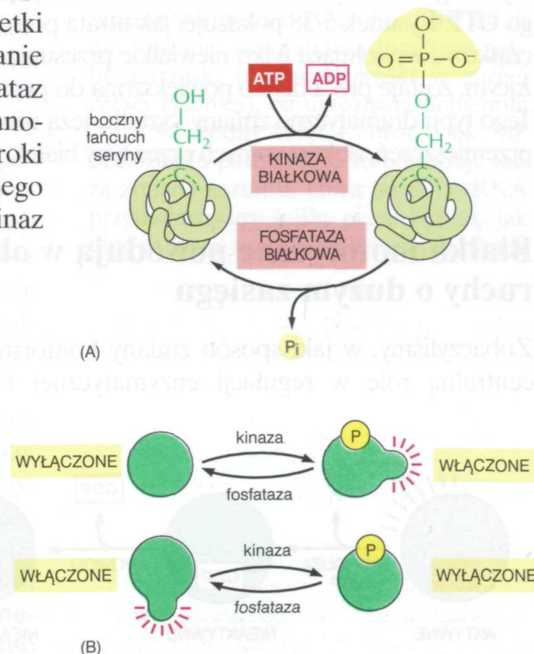


Rys. 5-35. Związanie liganda wpływa na równowagę między dwiema konformacjami białka. Schemat ukazuje hipotetyczny enzym, w którym wzrost stężenia cząsteczek ATP (*ciemnozielone kliny*) działa jako aktywator zwiększający szybkość utleniania cząsteczek cukru (*czerwone sześcioboki*). (A) Ten hipotetyczny enzym jest regulowany allosterycznie. Mógłby on na przykład katalizować ograniczający etap zarówno glikolizy, jak i cyklu kwasów trikarboksylowych, ponieważ ADP akumulując się reguluje — przez sprzężenie zwrotne — taki enzym w kierunku przyspieszenia katabolizmu cukru, a przez to zwiększenia produkcji ATP z ADP. (B) Gdy brakuje ADP, tylko niewielka frakcja cząsteczek spontanicznie przyjmuje konformację aktywną (zamkniętą), a większość z nich jest w konformacji nieaktywnej (otwartej). (C) Ponieważ ADP może wiązać się tylko z białkiem o konformacji zamkniętej, dodanie ADP obniża energię konformacji zamkniętej powodując przejście prawie wszystkich cząsteczek enzymu w formę aktywną

Ponieważ każda grupa fosforanowa nosi dwa ładunki ujemne, katalizowane enzymatycznie dodanie grupy fosforanowej do białka może wywołać w nim istotną zmianę konformacyjną, na przykład przez przybliżenie ugrupowania dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych.

W komórkach eukariotycznych ta odwracalna **fosforylacja białek** kontroluje aktywność wielu różnych typów białek; uważa się, że w każdym momencie więcej niż jedna trzecia spośród ok. 10 000 białek w typowej komórce ssaka jest ufosforylowana. Dodanie do specyficznych białek grupy fosforanowej lub jej usunięcie często zachodzi w odpowiedzi na sygnały, które wywołują jakąś zmianę w statusie komórki. Na przykład w ten sposób przebiega chronologiczna kontrola skomplikowanych procesów zachodzących podczas podziału komórki eukariotycznej (rozdz. 18), a także wiele sygnałów docierających w postaci hormonów lub neuroprzekaźników przekazywane jest od błony komórkowej do jądra poprzez kaskadę procesów fosforylowania białek (rozdz. 15).

Fosforylowanie białek polega na katalizowanym enzymatycznie przeniesieniu końcowej grupy fosforanowej ATP na hydroksylową grupę reszt seryny, treoniny lub tyrozyny w danym białku. Reakcja ta katalizowana jest przez **kinazę białkową** (kinazę białek), podczas gdy odwrotna reakcja usuwania grupy fosforanowej, czyli *defosforylacja* katalizowana jest przez **fosfatazę białkową** (fosfatazę białek) (rys. 5-36). Komórki zawierają setki różnych kinaz białkowych, z których każda odpowiada za fosforylowanie różnych białek lub ich zestawów. Tak samo istnieje wiele różnych fosfataz białkowych. Pewne z nich są wysoce specyficzne i usuwają grupy fosforanowe tylko z jednego lub z kilku białek, podczas gdy inne działają na szeroki wachlarz białek. W danej chwili stan ufosforylowania białka, a więc i jego aktywność zależy od względnych aktywności działających na nie kinaz i fosfataz białkowych.



Rys. 5-36. Fosforylowanie białek. W typowej komórce eukariotycznej wiele tysięcy białek ulega modyfikacji przez kowalencyjne dołączenie grupy fosforanowej. (A) Pokazana tu ogólna reakcja polega na przeniesieniu przez kinazę białkową grupy fosforanowej z ATP na łańcuch boczny aminokwasu białka docelowego. Drugi enzym, fosfataza białkowa katalizuje usunięcie grupy fosforanowej. W tym przykładzie fosforan łączy się z resztą seryny; w innych przypadkach fosforan wiąże się z grupą OH treoniny lub tyrozyny danego białka. (B) Fosforylacja białka przez kinazę białkową może albo zwiększyć albo zmniejszyć aktywność białka zależnie od miejsca fosforylacji i od struktury białka

W przypadku wielu białek grupa fosforanowa jest ustawicznie dodawana do określonej reszty aminokwasowej i następnie usuwana. Tego rodzaju cykle fosforylowania pozwalają białkom prawie natychmiastowo przełączać się z jednego stanu w drugi, a im szybciej taki cykl działa, tym szybciej może zmienić się stężenie ufosforylowanych białek w odpowiedzi na nagły bodziec, który zmienia szybkość ich fosforylowania. Energia potrzebna do tego cyklu pochodzi ze swobodnej energii hydrolizy ATP, którego jedna cząsteczka zostaje zużyta na każdy obrót cyklu.

Białka wiążące GTP mogą ulegać silnym zmianom konformacyjnym

Utrata grupy fosforanowej powoduje silną zmianę konformacyjną również w obszernej klasie białek komórkowych, którymi są **białka wiążące GTP (białka G)**. Aktywność tych białek jest kontrolowana przez wiązanie nukleotydów guaninowych — trifosforanu guanozyny (GTP) albo difosforanu guanozyny (GDP). Białka takie są w konformacji aktywnej, gdy są związane z GTP; jednak wtedy same hydrolizują tę cząsteczkę do GDP, uwalniając fosforan, i przechodzą w konformację nieaktywną. Proces ten jest odwracalny, podobnie jak fosforylowanie białek. Konformacja aktywna zostaje przywrócona przez oddysocjowanie GDP, po którym następuje związanie nowej cząsteczki GTP (rys. 5-37).

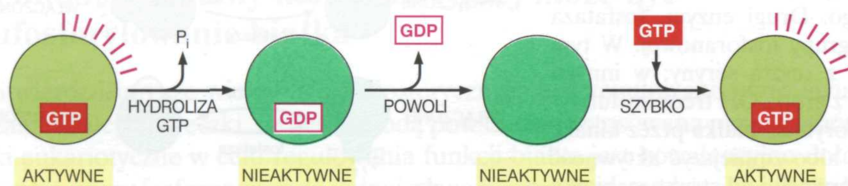
Duża nadrodzina tych białek wiążących GTP działa w komórce jako przełączniki molekularne. Oddysocjowanie GDP i zastąpienie go przez GTP, stanowiące „włączenie" przełącznika, następuje często w odpowiedzi na sygnał otrzymany przez komórkę. Wiele białek wiążących GTP wiąże się z innymi białkami w celu kontroli aktywności enzymatycznej, a ich kluczowe znaczenie w wewnątrzkomórkowej drodze przekazywania sygnałów będzie omówione w rozdz. 15. Tu przyjrzymy się ogólnemu mechanizmowi działania na przykładzie bakteryjnego czynnika elongacyjnego EF-Tu, małego białka wiążącego GTP, które pomaga wprowadzać cząsteczki t-RNA do rybosomu podczas syntezy białka.

Pytanie 5-9. Wyjaśnij, w jaki sposób fosforylacja lub wiązanie nukleotydów mogą regulować aktywność białka. Wymień zalety każdego z tych sposobów regulacji.

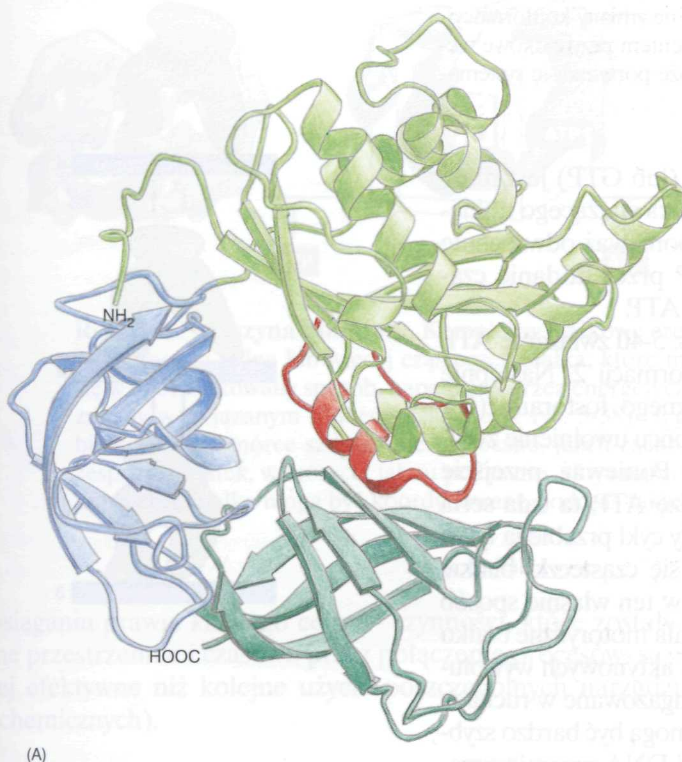
Analiza trójwymiarowej struktury EF-Tu pokazała, w jaki sposób przejście allosteryczne wzbudzone uzyskaniem lub utratą fosforanu w związanym nukleotydzie guaninowym — może wywołać znaczącą zmianę kształtu białka wiążącego GTP. Rysunek 5-38 pokazuje, jak utrata pojedynczej grupy fosforanowej, początkowo wywołująca tylko niewielkie przesunięcie o ok. 0,1 nm w miejscu wiążącym, zostaje przez białko powiększona do przemieszczenia 50 razy większego. Tego typu dramatyczne zmiany kształtu leżą również u podstaw bardzo dużych przemieszczeń, dokonywanych przez typy białek, które będziemy teraz omawiać.

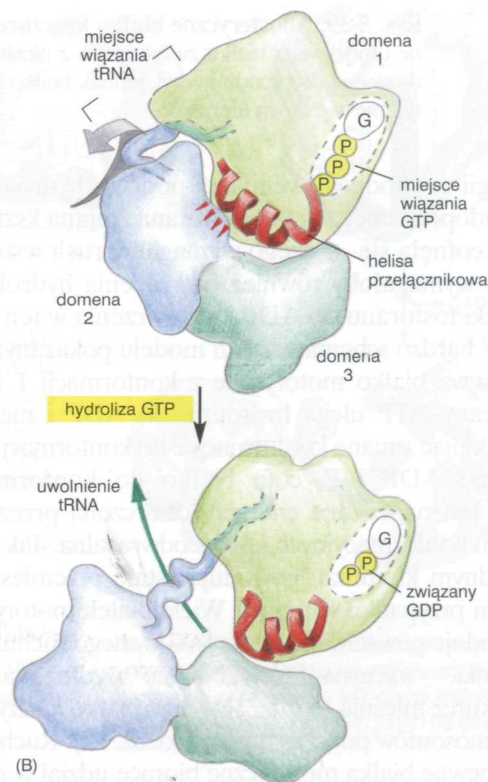
Białka motoryczne powodują w obrębie komórek ruchy o dużym zasięgu

Zobaczyliśmy, w jaki sposób zmiany konformacyjne w białkach odgrywają centralną rolę w regulacji enzymatycznej i sygnalizacji komórki. Teraz



Rys. 5-37. Białka wiążące GTP tworzą przełączniki molekularne. Aktywność białek wiążących GTP z zasady wymaga obecności ściśle związanej cząsteczki GTP (przełącznik na pozycji „włączone"). Hydroliza cząsteczki GTP wytwarza GDP oraz fosforan nieorganiczny (P_i) i powoduje przejście białka w odmienną, zazwyczaj nieaktywną konformację (przełącznik w pozycji „wyłączone"). Jak tu pokazano, ponowne ustawienie przełącznika w pozycji wyjściowej wymaga oddysocjowania ściśle związanego GDP; ten etap jest powolny, ale znacznie przyspieszany przez swoiste sygnały. Po odejściu GDP białko szybko ponownie wiąże GTP



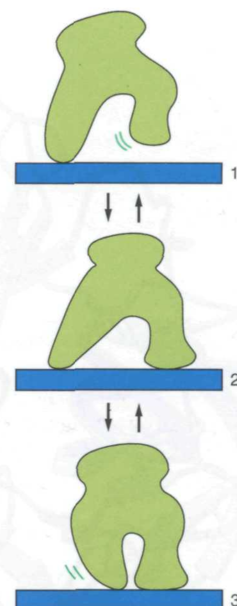


Rys. 5-38. Hydroliza nukleotydu powoduje dużą zmianę konformacyjną. (A) Czynnik elongacyjny EF-Tu. (B) Hydroliza GTP związanego z EF-Tu powoduje bezpośrednio tylko niewielką (odpowiadającą kilkakrotności promienia atomu wodoru) zmianę pozycji aminokwasu w miejscu wiążącym nukleotyd. Jednak ta mała zmiana zostaje zwielokrotniona przez zmiany konformacyjne w obrębie białka tak, iż prowadzi do znacznie większego przesunięcia. Hydroliza GTP uwalnia wiązanie wewnątrzcząsteczkowe, jakby zatrzask, (*czerwone prążki* w górnej części rysunku), co umożliwia domenom 2 i 3 swobodny skręt i obrót o ok. 90° w kierunku patrzącego. To powoduje dużą zmianę kształtu, która uwalnia tRNA przytrzymywany ściśle przez białko, jak tego wymaga synteza białka na rybosomie

omówimy, jak umożliwiają one białkom, których główną funkcją jest przemieszczanie innych cząsteczek — **białkom motorycznym** — wytwarzanie sił odpowiedzialnych za skurcz mięśnia i większe ruchy komórki. Białka motoryczne zasilają również ruchy wewnątrzkomórkowe zachodzące na mniejszą skalę: pomagają w przesuwaniu chromosomów ku przeciwnym krańcom komórki podczas mitozy (rozdz. 17), przesuwają organelle wzdłuż molekularnych torów w obrębie komórki (rozdz. 16) i przesuwają enzymy wzdłuż nici DNA podczas syntezy nowej cząsteczki DNA (rozdz. 6). Zrozumienie, jak białka mogą działać jako cząsteczki o ruchomych częściach, jest więc istotne dla zrozumienia molekularnych podstaw zachowania się komórki.

Postarajmy się wyjaśnić, w jaki sposób zmiany kształtu białka są wykorzystywane do powstawania w komórce uporządkowanych ruchów. Jeśli na przykład białko ma wędrować wzdłuż cienkiej nici, takiej jak cząsteczka DNA, może tego dokonać przechodząc serię zmian konformacyjnych — co ilustruje rys. 5-39. Jednak bez czynnika, który nadawałby tym zmianom uporządkowaną sekwencję, będą one całkowicie odwracalne i białko będzie wędrować przypadkowo tam i z powrotem wzdłuż nici. Możemy jednak spojrzeć na tę sytuację w inny sposób. Ponieważ kierunkowy ruch białka to wykonanie konkretnej pracy, prawa termodynamiki (patrz rozdz. 3) wymagają, aby taki ruch zużywał energię z jakiś innych źródeł (w przeciwnym razie białka można by użyć jako maszyny o samoistnym napędzie). Dlatego też bez dostarczenia energii cząsteczka białka może tylko wędrować bez celu.

Jak można więc sprawić, by seria zmian konformacyjnych przebiegała jednokierunkowo? Aby zmusić cały cykl do przebiegu w jednym kierunku, wystarczy, żeby jakakolwiek zmiana kształtu stała się nieodwracalna. W przypadku większości białek zdolnych do wędrowania w jednym kierunku na duże odległości zostało to osiągnięte przez sprzężenie jednej ze zmian konformacyjnych z hydrolizą cząsteczki ATP związanej z białkiem. Mechanizm jest podobny do tego, który dopiero co omówiono opisując wymuszanie allosterycznych zmian kształtu przez hydrolizę GTP. Ze względu na dużą ilość



Rys. 5-39. Allosteryczne białko kroczące. Trzy różne zmiany konformacyjne umożliwiają białku związanemu z nicią lub filamentem przypadkowe wędrowanie do przodu i w tył, jednak białko to nie może poruszać się systematycznie w jednym kierunku

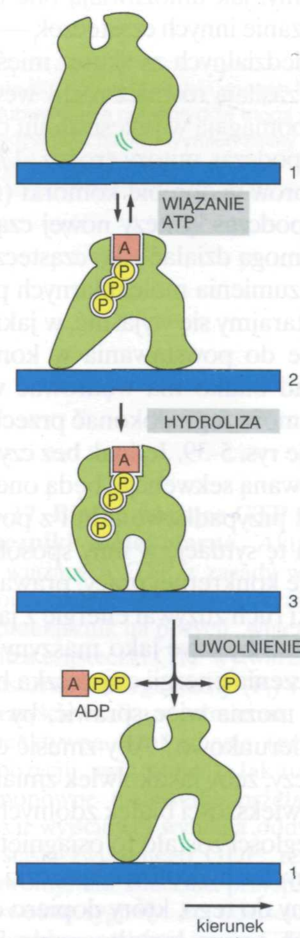
energii swobodnej uwalnianej podczas hydrolizy ATP (lub GTP) jest mało prawdopodobne, aby tak wywołana zmiana kształtu białka wiążącego nukleotyd cofnęła się — czego wymagałby ruch wstecz — ponieważ odwrócenie takie wymagałoby również odwrócenia hydrolizy ATP przez dodanie cząsteczki fosforanu do ADP i wytworzenia w ten sposób ATP.

W bardzo schematycznym modelu pokazanym na rys. 5-40 związanie ATP przesuwa białko motoryczne z konformacji 1 do konformacji 2. Następnie związany ATP ulega hydrolizie do ADP i nieorganicznego fosforanu (P_i), powodując zmianę konformacji 2 do konformacji 3. W końcu uwolnienie związanego ADP i P_i cofa białko do konformacji 1. Ponieważ przejście 2→3 jest napędzane energią dostarczoną przez hydrolizę ATP, ta cała seria zmian konformacyjnych jest nieodwracalna. Tak więc cały cykl przebiega tylko w jednym kierunku, powodując stałe przemieszczanie się cząsteczki białka, w tym przypadku w prawo. Wiele białek motorycznych w ten właśnie sposób powoduje powstawanie ukierunkowanego ruchu; tak działa motoryczne białko mięśnia — *miozyna*, która „biegnie" wzdłuż filamentów aktynowych wywołując skurcz mięśnia (rozdz. 16), oraz białko *kinezyna*, zaangażowane w ruchach chromosomów podczas mitozy (rozdz. 17). Ruchy takie mogą być bardzo szybkie; pewne białka motoryczne biorące udział w replikacji DNA przemieszczają się wzdłuż nici DNA z szybkością sięgającą 1000 nukleotydów na sekundę.

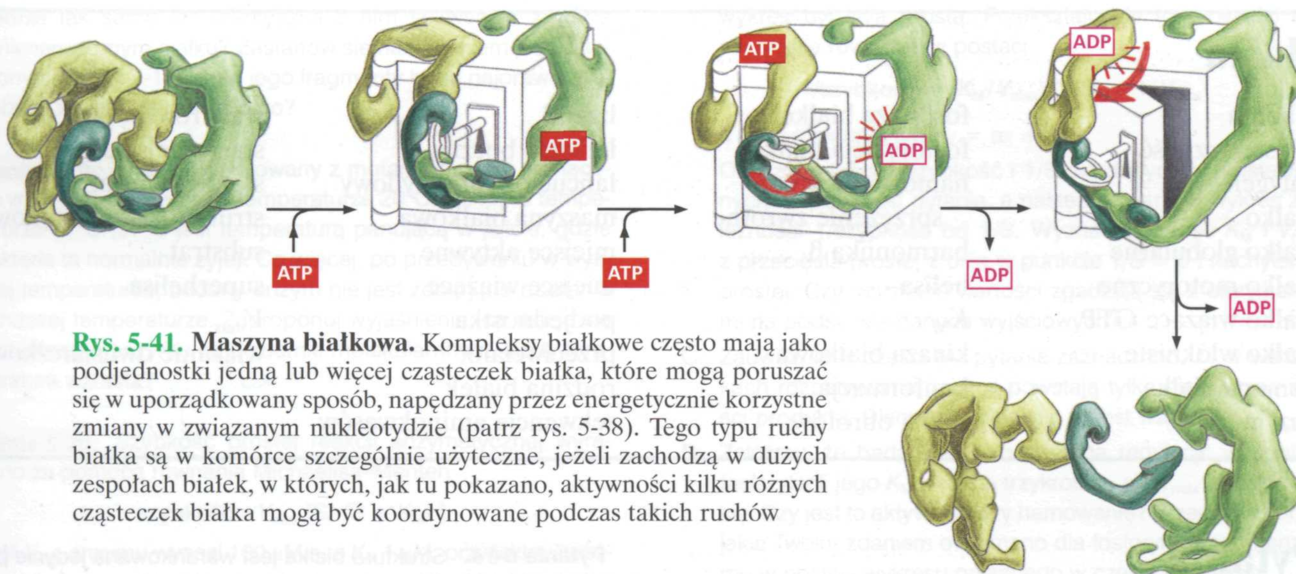
Białka tworzą często duże kompleksy działające jak maszyny białkowe

Kiedy przechodzi się od małych białek o pojedynczej domenie do dużych białek utworzonych z wielu domen, funkcje, które te białka pełnią, stają się bardziej złożone. Jednak największe wrażenie wywołują czynności spełniane przez wielkie kompleksy białek utworzone z wielu cząsteczek. Teraz, kiedy jest możliwe rekonstruowanie w laboratorium procesów biologicznych w układzie pozakomórkowym, staje się jasne, że każdy kluczowy proces w komórce — taki jak replikacja DNA, synteza białka, „pączkowanie" pęcherzyków lub sygnalizacja transbłonowa — jest katalizowany przez wysoce skoordynowany zestaw przynajmniej dziesięciu białek. W większości tych **maszyn białkowych** hydroliza związanych trifosforanów nukleozydów (ATP lub GTP) stanowi napęd uporządkowanej serii zmian konformacyjnych w poszczególnych podjednostkach białkowych, umożliwiając całemu kompleksowi białek skoordynowany ruch. W ten sposób odpowiednie enzymy mogą być przemieszczane wprost w miejsca, gdzie są potrzebne, aby prowadzić serię sukcesywnych reakcji, np. w syntezie białka na rybosomach (rozdz. 7) lub w replikacji DNA, podczas której wielki wielobiałkowy kompleks przesuwa się szybko wzdłuż DNA. Prostą analogię mechaniczną ilustruje rys. 5-41.

Komórki wytworzyły maszyny białkowe z tych samych powodów, z których ludzie wymyślili maszyny mechaniczne i elektroniczne: ponieważ —



Rys. 5-40. Allosteryczne białko motoryczne. Uporządkowane przejście między trzema kolejnymi konformacjami napędza hydroliza związanej cząsteczki ATP. Tylko jedno z tych przejść jest związane z hydrolizą ATP, ale to wystarcza, aby cały cykl stał się w zasadzie nieodwracalny. Dzięki powtarzającym się cyklom białko przesuwa się stale wzdłuż nici w prawo



Rys. 5-41. Maszyna białkowa. Kompleksy białkowe często mają jako podjednostki jedną lub więcej cząsteczek białka, które mogą poruszać się w uporządkowany sposób, napędzany przez energetycznie korzystne zmiany w związanym nukleotydzie (patrz rys. 5-38). Tego typu ruchy białka są w komórce szczególnie użyteczne, jeżeli zachodzą w dużych zespołach białek, w których, jak tu pokazano, aktywności kilku różnych cząsteczek białka mogą być koordynowane podczas takich ruchów

w osiąganiu prawie każdego celu — czynności, które zostały skoordynowane przestrzennie i czasowo przez połączenie procesów, są znacznie bardziej efektywne niż kolejne użycie poszczególnych narzędzi (tu: reakcji biochemicznych).

Pytanie 5-10. Wyjaśnij, dlaczego enzymom na rys. 5-41 jest dużo łatwiej otworzyć wejście, gdy pracują jako kompleks białek, niż gdyby działały niezależnie, jeden po drugim.

Streszczenie

- Żywe komórki zawierają niezwykle zróżnicowany zestaw cząsteczek białka, z których każda jest liniowym łańcuchem aminokwasów powiązanych kowalencyjnie.
- Każdy typ białka ma unikatową sekwencję aminokwasów, która determinuje zarówno jego trójwymiarowy kształt, jak i aktywność biologiczną.
- Pofałdowana struktura białka jest stabilizowana przez niekowalencyjne oddziaływania między różnymi częściami łańcucha polipeptydowego.
- Wiązania wodorowe między sąsiadującymi regionami szkieletu polipeptydowego mogą prowadzić do powstania regularnych form sfałdowania znanych jako α helisy i struktury β.
- W budowie wielu białek można wyróżnić mniejsze regiony o zwartej strukturze trójwymiarowej, określane jako domeny białka.
- Biologiczna funkcja białka zależy od szczegółowych właściwości chemicznych jego powierzchni oraz od sposobu, w jaki wiąże ono inne cząsteczki, zwane ligandami.
- Enzymy są białkami, które wiążą się ściśle ze specyficznymi cząsteczkami zwanymi substratami, a następnie katalizują w tych cząsteczkach powstanie lub rozpad wiązań kowalencyjnych.
- W miejscu aktywnym enzymu łańcuchy boczne aminokwasów w pofałdowanym białku są tak precyzyjnie ustawione, że wspomagają utworzenie stanów przejściowych o wysokiej energii, przez które substraty muszą przejść, aby ulec reakcji.
- Trójwymiarowa struktura wielu białek rozwinęła się tak, że związanie małych ligandów może wywołać znaczącą zmianę kształtu białka.
- Większość enzymów jest białkami allosterycznymi, które mogą istnieć w dwóch konformacjach różniących się aktywnością katalityczną; enzym może zostać włączony do akcji lub z niej wyłączony przez ligandy, które wiążąc się do wyróżnionych miejsc regulatorowych stabilizują konformację aktywną lub nieaktywną.
- Aktywności wielu enzymów w komórce są ściśle regulowane. Najczęstszą formą regulacji jest hamowanie przez sprzężenie zwrotne, w którym enzym znajdujący się na początku szlaku metabolicznego jest hamowany przez związanie jednego z końcowych produktów tego szlaku.
- Wiele tysięcy białek w typowej komórce eukariotycznej jest regulowane albo przez cykl fosforylacji i defosforylacji, albo poprzez związanie i hydrolizę GTP przez współdziałające białko wiążące GTP.
- Hydrolizowanie ATP do ADP przez białka motoryczne prowadzi do ukierunkowanych ruchów w komórce.
- Maszyny białkowe o wysokim stopniu efektywności powstają przez wytworzenie kompleksów białek allosterycznych, w których zmiany konformacyjne są skoordynowane w celu przeprowadzenia złożonych funkcji komórkowych.

Hasła

α helisa
allosteryczność
antygen
białko
białko globularne
białko motoryczne
białko wiążące GTP
białko włókniste
domena białka
enzym
fosfataza białkowa
fosforylacja białka
hamowanie przez sprzężenie zwrotne
harmonijka β
helisa
K_M
kinaza białkowa
konformacja
liczba obrotów
ligand
łańcuch boczny
łańcuch polipeptydowy
maszyna białkowa
miejsce aktywne
miejsce wiążące
podjednostka
przeciwciało
rodzina białek
sekwencja aminokwasów
stała równowagi
stan przejściowy
stan równowagi
struktura drugorzędowa
substrat
superhelisa
V_{max}
wiązanie dwusiarczkowe

Pytania

Pytanie 5-11. Które z poniższych twierdzeń jest prawdziwe? Uzasadnij odpowiedź.

A. Miejsce aktywne enzymu zajmuje zazwyczaj tylko niewielką część jego powierzchni.
B. Niektóre enzymy katalizują tworzenie wiązania kowalencyjnego między łańcuchem bocznym aminokwasu i cząsteczką substratu
C. Harmonijka β może zawierać do pięciu nici, ale nie więcej.
D. Specyficzność cząsteczki przeciwciała determinują wyłącznie pętle na powierzchni domeny pofałdowanego łańcucha lekkiego.
E. Enzymy obniżając energię aktywacji reakcji zmieniają punkt równowagi.
F. Liczba możliwych ułożeń aminokwasów w sekwencji liniowej jest tak duża, że nowe białka prawie nigdy nie powstają wskutek zmian w białkach już istniejących.
G. K_M enzymu jest miarą maksymalnej szybkości reakcji katalizowanej przez ten enzym.
H. Enzymy allosteryczne mają dwa lub więcej miejsc wiążących.
I. Wiązania niekowalencyjne są zbyt słabe, aby oddziaływać na strukturę przestrzenną makrocząsteczek.
J. Chromatografia powinowactwa pozwala rozdzielać cząsteczki na podstawie ich ładunku wypadkowego.
K. Podczas wirowania homogenatu komórkowego mniejsze organelle podlegają mniejszemu tarciu i dlatego sedymentują szybciej niż większe organelle.

Pytanie 5-12. Jaka wspólna cecha α helis i harmonijek β sprawia, że stanowią one podstawową jednostkę budowy białek?

Pytanie 5-13. Rozważ poniższe twierdzenie: „Zarówno enzymy jak i temperatura przyspieszają reakcje, które — chociaż termodynamicznie możliwe — nie przebiegają z odpowiednią szybkością, ponieważ wymagają wysokiej energii aktywacji. Choroby leczone poprzez troskliwe aplikowanie ciepła, na przykład podawanie gorącego rosołu, wynikają zapewne z niewystarczającej aktywności enzymów".

Pytanie 5-14. Struktura białka jest warunkowana jedynie przez jego sekwencję aminokwasową. Czy białko, w którym metodami inżynierii genetycznej odwrócono kolejność ułożenia wszystkich aminokwasów, będzie miało tę samą strukturę przestrzenną co białko wyjściowe?

Pytanie 5-15. Załóżmy, że następująca sekwencja białka tworzy α helisę: Leu-Lys-Arg-Ile-Val-Asp-Ile-Leu-Ser-Arg-Leu-Phe-Lys-Val. Ile skrętów miałaby ta helisa? Czy ułożenie rozpatrywanej sekwencji aminokwasów po zwinięciu w α helisę charakteryzuje się czymś szczególnym? (Wskazówka: weź pod uwagę właściwości aminokwasów przedstawione na rys. 5-3.)

Pytanie 5-16. Prostą reakcję enzymatyczną można często opisać równaniem



$$E + S \rightleftarrows ES \rightarrow EP \rightleftarrows E + P$$

gdzie E, S i P — odpowiednio: enzym, substrat i produkt.

A. Co w tym równaniu oznacza ES?
B. Dlaczego pierwszy etap przedstawiono za pomocą strzałki dwukierunkowej, a do przedstawienia drugiego etapu użyto strzałki jednokierunkowej?
C. Dlaczego E występuje na obu końcach równania?
D. Często okazuje się, że duże stężenie P hamuje enzym. Wyjaśnij, dlaczego tak się dzieje.
E. Związek X jest podobny do S i wiąże się z miejscem aktywnym enzymu, ale nie podlega reakcji katalizowanej przez enzym. Jaki wpływ na reakcję będzie miało dodanie X? Porównaj skutek dodania X i nagromadzenia P.

Pytanie 5-17. Które z wymienionych poniżej aminokwasów powinny Twoim zdaniem występować częściej w pobliżu środka pofałdowanego białka globularnego, a które na jego powierzchni? Uzasadnij swoją odpowiedź. Ser, Ser-P (fosforylowana reszta seryny), *Leu, Lys, Gln, His, Phe, Val, Ile, Met, Cys-S-S-Cys* (dwie reszty cysteiny połączone wiązaniem dwusiarczkowym) i Glu. Gdzie Twoim zdaniem znajdzie się pierwszy aminokwas z końca aminowego, a gdzie pierwszy z końca karboksylowego?

Pytanie 5-18. Załóżmy, że planujesz otrzymanie i następnie badanie fragmentów białka. Czy możesz przyjąć, że jakikolwiek fragment łańcucha polipeptydowego będzie się zwijał do-

kładnie tak samo jak identyczna z nim sekwencja zawarta w nienaruszonym białku? Zastanów się nad białkiem przedstawionym na rys. 5-12. Które jego fragmenty będą najprawdopodobniej zwijały się prawidłowo?

Pytanie 5-19. Enzym wyizolowany z mutanta bakterii rosnącego w 20°C jest aktywny w temperaturze 20°C, ale nie w temperaturze 37°C (37°C jest temperaturą panującą w jelicie, gdzie bakteria ta normalnie żyje). Co więcej, po przebywaniu w wyższej temperaturze, badany enzym nie jest zdolny do działania w niższej temperaturze. Zaproponuj wyjaśnienie, co dzieje się z cząsteczką enzymu na poziomie molekularnym, kiedy temperatura wzrasta?

Pytanie 5-20. Szybkość prostej reakcji enzymatycznej wyrażono za pomocą równania Michaelisa–Menten

$$\text{szybkość} = V_{max}\,[S/\,(S + K_M)\,]$$

Jeśli V_{max} enzymu wynosi 100 μM/s, a K_M 1 μM, przy jakim stężeniu substratu szybkość reakcji będzie równa 50 μM /s? Wykonaj wykres zależności szybkości od stężenia substratu (S) dla S od 0 do 10 mM. Przekształć otrzymany wykres w wykres zależności odwrotności: 1/szybkość od 1/S. Dlaczego w wyniku takiego przekształcenia otrzymuje się wykres w postaci linii prostej?

Pytanie 5-21. Wybierz prawidłową spośród podanych niżej możliwości. Jeżeli S jest dużo mniejsze od K_M, to miejsce aktywne enzymu jest w większości *zajęte/niezajęte*. Jeśli S jest dużo większe od K_M, to szybkość reakcji jest ograniczona stężeniem *enzymu/substratu*. Uzasadnij swój wybór.

Pytanie 5-22.

A. Szybkość reakcji S → P katalizowanej przez enzym E mierzono w warunkach prowadzących do powstania tylko niewielkiej ilości produktu. Uzyskano następujące dane:

stężenie substratu (μM)	szybkość reakcji (μM/min)
0,08	0,15
0,12	0,21
0,54	0,7
1,23	1,1
1,82	1,3
2,72	1,5
4,94	1,7
10,00	1,8

Przedstaw powyższe dane na wykresie. Wykorzystaj otrzymany wykres do wyznaczenia K_M i V_{max} badanego enzymu.

B. Aby bardziej dokładnie wyznaczyć wartość stałej K_M i szybkości maksymalnej, stosuje się często zabieg polegający na przekształceniu równania Michaelisa–Menten tak, aby wykres był linią prostą. Przekształcenie to prowadzi do uzyskania równania w postaci

$$1/\text{szybkość} = (K_M/V_{max})\,(1/S) + 1/V_{max}$$

a więc równania typu $y = ax + b$.

Oblicz wartości 1/szybkość i 1/S dla danych przedstawionych w części (A) pytania, a następnie narysuj wykres zależności 1/szybkość od 1/S. Wyznacz wartość K_M i V_{max} z przecięcia prostej z osią w punkcie 1/S = 0 i nachylenia prostej. Czy uzyskane wartości zgadzają się z otrzymanymi na podstawie danych wyjściowych?

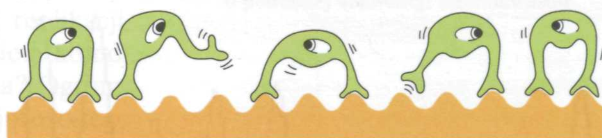
C. Zauważ, iż w części (A) pytania zaznaczono, że w warunkach rozpatrywanej reakcji powstają tylko nieznaczne ilości produktu. Dlaczego założenie to jest ważne?

D. Załóżmy, że badany enzym podlega regulacji: w wyniku fosforylacji jego K_M wzrasta trzykrotnie, ale V_{max} nie zmienia się. Czy jest to aktywacja czy hamowanie? Przedstaw dane, jakie Twoim zdaniem otrzymano dla fosforylowanego enzymu w postaci wykresu opisanego w części (A) i (B).

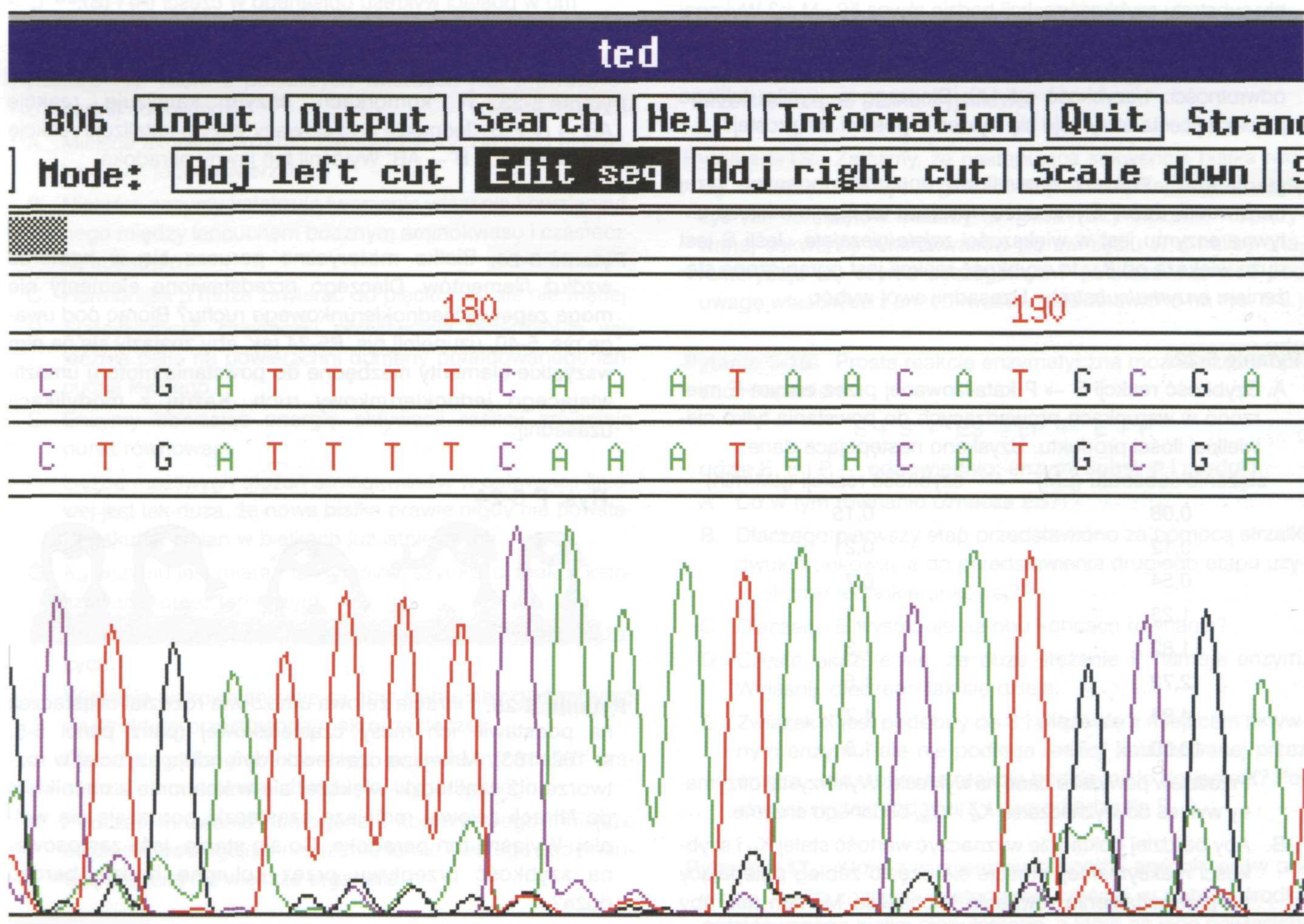
Pytanie 5-23. W komórkach enzym katalizuje reakcję AB → A + B. Jednakże wyizolowany enzym katalizuje reakcję odwrotną A + B → AB. Wyjaśnij ten jawny paradoks.

Pytanie 5-24. Białko motoryczne porusza się w komórce wzdłuż filamentów. Dlaczego przedstawione elementy nie mogą zapewnić jednokierunkowego ruchu? Biorąc pod uwagę rys. 5-40, uzupełnij rys. P5-24 tak, aby znalazły się na nim wszystkie elementy niezbędne do powstania motoru umożliwiającego jednokierunkowy ruch. Każdą z modyfikacji uzasadnij.

Rys. P 5-24



Pytanie 5-25. Filtracja żelowa umożliwia rozdział cząsteczek na podstawie ich masy cząsteczkowej (patrz panel 5-5, s. 162–163). Mniejsze cząsteczki dyfundują szybciej w roztworze niż cząsteczki większe, ale w kolumnie z nośnikiem do filtracji żelowej mniejsze cząsteczki poruszają się wolniej. Wyjaśnij ten paradoks. Co się stanie, jeśli zastosowana szybkość przepływu przez kolumnę będzie bardzo duża?



Technologia DNA zrewolucjonizowała badania komórki i obecnie dysponujemy szybkimi i sprawnie działającymi automatami do sekwencjonowania DNA. Umożliwiło to przyjęcie kilku ważnych międzynarodowych programów sekwencjonowania genomów, których celem jest poznanie sekwencji DNA haploidalnych genomów różnych organizmów, od drożdży do człowieka. Na rysunku przedstawiono małą część danych uzyskiwanych podczas automatycznego sekwencjonowania DNA w takiej formie, w jakiej dane te pojawiają się na ekranie komputera (obsługującego sekwenator DNA). Każdy barwny wierzchołek odpowiada kolejnemu nukleotydowi w sekwencji DNA; można tu dobrze odczytać odcinek sekwencji nukleotydów pomiędzy pozycjami 173 a 195 od startu sekwencji. Przedstawiony przykład zaczerpnięto z międzynarodowego projektu sekwencjonowania całego genomu rośliny *Arabidopsis*. (Dzięki uprzejmości: George Murphy) (patrz rozdz. 10, s. 313)

6

DNA

STRUKTURA I FUNKCJA DNA

- **Tworzywem genów jest DNA**
- **Cząsteczka DNA zawiera dwa komplementarne łańcuchy polinukleotydowe**
- **Struktura DNA umożliwia funkcjonowanie mechanizmów dziedziczenia**

REPLIKACJA DNA

- **Synteza DNA rozpoczyna się w określonych miejscach początku replikacji**
- **Nowe łańcuchy DNA są tworzone w widełkach replikacyjnych**
- **Widełki replikacyjne są asymetryczne**
- **Polimeraza DNA koryguje swoje błędy**
- **Jako startery do syntezy DNA służą krótkie odcinki RNA**
- **Współpracujące ze sobą białka tworzą w widełkach replikacyjnych aparat replikacyjny**

NAPRAWA DNA

- **Zmiany w DNA są przyczyną mutacji**
- **System naprawy źle dopasowanych par zasad usuwa błędy, które uniknęły korekty przez aparat replikacyjny**
- **Komórkowy DNA jest stale narażony na uszkodzenia**
- **Stabilność genów zależy od naprawy DNA**
- **Duża zachowawczość DNA oznacza, że podobne gatunki zawierają białka o podobnej sekwencji aminokwasów**

Życie zależy od zdolności komórek do przechowywania, odczytywania i tłumaczenia instrukcji genetycznych koniecznych do powstania i trwania żywego organizmu.

Ta *dziedziczna* informacja jest przekazywana z komórki macierzystej na komórki potomne i z jednej generacji organizmów na następne. Informacje genetyczne są przechowywane w każdej żywej komórce w postaci **genów** — elementów determinujących charakterystyczne cechy gatunku jako całości i cechy osobnicze w obrębie gatunku. Od czasu pojawienia się genetyki jako dziedziny wiedzy na początku dwudziestego wieku badacze stale dociekali, z jakiego materiału zrobione są geny. Informacja zawarta w genach jest kopiowana i przekazywana w stanie w zasadzie niezmienionym z komórki macierzystej do komórek potomnych miliony razy w ciągu życia organizmu wielokomórkowego. Jaki rodzaj cząsteczek może wykazywać zdolność do tak dokładnej i prawie nieograniczonej replikacji, a równocześnie do sterowania organizmem i codziennym życiem komórek? Jakiego rodzaju instrukcje zawiera informacja genetyczna? Ogromna ilość informacji potrzebnych do rozwoju i trwania nawet najprostszego organizmu musi zmieścić się w mikroskopijnej objętości komórki. Jak to jest fizycznie możliwe?

Odpowiedzi na niektóre z tych pytań zaczęły się pojawiać w latach 1940., kiedy na podstawie badań prostych grzybów odkryto, że informacja genetyczna jest przede wszystkim zbiorem instrukcji dotyczących wytwarzania białek. Białka są makrocząsteczkami, które realizują większość funkcji komórkowych: służą one jako elementy budowlane struktur komórkowych (rozdz. 5); funkcjonują jako enzymy katalizujące wszystkie reakcje zachodzące w komórce (rozdz. 3); regulują ekspresję genów (rozdz. 8); umożliwiają komórkom wykonywanie ruchów (rozdz. 16) oraz zapewniają komunikację między komórkami (rozdz. 15). Właściwości i funkcjonowanie komórki prawie całkowicie zależą od wytwarzanych przez nią białek. Trudno sobie wyobrazić, jakie inne instrukcje mógłby kodować materiał genetyczny. Innym istotnym osiągnięciem dokonanym w latach czterdziestych było stwierdzenie, że prawdopodobnym nośnikiem informacji genetycznej jest **kwas deoksyrybonukleinowy (DNA)**. Jednak mechanizm, poprzez który informacja genetyczna jest kopiowana i przenoszona z komórki do komórki oraz sposób kodowania białek przez

DNA pozostawały zagadką aż do roku 1953, kiedy James Watson i Francis Crick określili strukturę DNA. Poznanie struktury DNA automatycznie rozwiązało problem kopiowania, czyli *replikacji* DNA i dostarczyło pierwszych wskazówek sugerujących, jak cząsteczka DNA może kodować instrukcje dotyczące wytwarzania białek. W obecnym rozdziale skupimy się na pytaniu, w jaki sposób struktura DNA umożliwia jego wierną replikację i zachowanie informacji genetycznej, pokrótce tylko wyjaśniając, w jaki sposób cząsteczka DNA koduje syntezę białek. Szczegóły *kodu genetycznego* i aparatu dekodującego odkładamy do następnego rozdziału.

Ilość informacji zmagazynowanej w komórkowym DNA jest ogromna. Przekonamy się, że każda komórka zawiera nie tylko skomplikowany aparat dokładnie kopiujący ten magazyn informacji, lecz także wyspecjalizowane enzymy dokonujące naprawy DNA, jeśli ulegnie on uszkodzeniu. Pomimo jednak tych systemów chroniących informację genetyczną przed błędnym kopiowaniem i przypadkowymi uszkodzeniami, czasami występują trwałe zmiany, czyli *mutacje*. Mutacje w DNA często wpływają na informację w nim zakodowaną. Czasami mutacja może być dla organizmu korzystna: na przykład mutacje mogą uodparniać bakterie na antybiotyki stosowane do ich zabijania. Akumulowanie się zmian w DNA podczas milionów lat ewolucji wprowadziło zmiany w materiale genetycznym odróżniające jeden gatunek od drugiego. Wprowadziło ono także mniejsze zmiany decydujące o różnicach osobniczych w obrębie tego samego gatunku, co łatwo możemy obserwować w odniesieniu do ludzi lub zwierząt (rys. 6-1). Większość mutacji jest jednak szkodliwa. Mutacje są odpowiedzialne za tysiące dziedzicznych schorzeń ludzi. Mutacje powstające w komórkach podczas życia jakiegoś osobnika także mogą powodować schorzenia, czego najbardziej widocznym przykładem są różne rodzaje raka. Bez systemów komórkowych, które stale monitorują DNA i usuwają uszkodzenia, życie prawdopodobnie w ogóle nie mogłoby istnieć.



Rys. 6-1. Zdjęcie rodzinne ilustrujące przekazywanie informacji genetycznej z jednego pokolenia na następne. Trójka dzieci jest podobna do siebie, a także do swoich rodziców bardziej niż do innych ludzi, ponieważ odziedziczyła geny swoich rodziców.

Kot wykazuje wiele cech wspólnych z człowiekiem, ale podczas milionów lat ewolucji dzielących ludzi od kotów zarówno ludzie, jak i koty zakumulowały wiele dziedzicznych zmian decydujących, że tworzymy zupełnie odrębne gatunki. Krewniakiem jeszcze bardziej odległym genetycznie jest kura

Struktura i funkcja DNA

We wczesnych latach dwudziestych dwudziestego wieku biologowie zauważyli, że geny są przenoszone na *chromosomach*, znanych wówczas jako niciowate struktury w jądrach komórek eukariotycznych. Struktury te stawały się widoczne w początkach podziału komórkowego (rys. 6-2). Później, gdy już były możliwe analizy biochemiczne, stwierdzono, że chromosomy składają się z DNA i białek. Ponieważ DNA był wówczas postrzegany jako stosunkowo prosta cząsteczka, początkowo przyjmowano, że geny są zbudowane z białek, znacznie bardziej zróżnicowanych chemicznie. Rolę pełnioną w chromosomach przez białka omówimy szczegółowo w rozdz. 8. W tym rozdziale przedstawimy, w jaki sposób struktura i chemiczne właściwości DNA idealnie kwalifikują go do roli materiału genetycznego, mimo prostoty jego budowy chemicznej. Geny każdej komórki na Ziemi są zrobione z DNA, a wgląd w zależność między DNA a genami pochodzi z doświadczeń przeprowadzonych na bardzo licznych i rozmaitych organizmach.

Tworzywem genów jest DNA

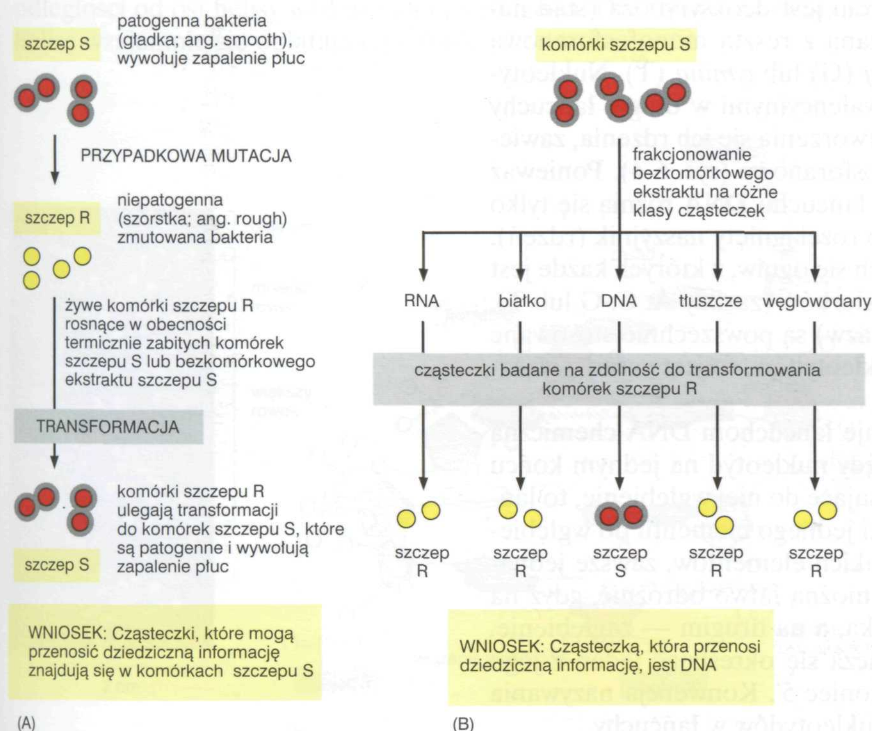
Pierwszy dowód wskazujący, że materiałem genetycznym jest DNA, uzyskano w 1944 r. Wykazano wtedy, że dodanie do bakterii oczyszczonego DNA zmieniło ich właściwości, przy czym były one przekazywane na

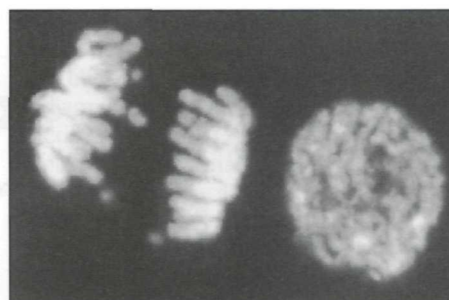
następne pokolenia bakterii (rys. 6-3). Obecnie fakt, że materiałem genetycznym jest DNA, ma tak podstawowe znaczenie dla całej filozofii biologii, że nawet trudno sobie wyobrazić, jak wielką lukę intelektualną wypełniło to odkrycie.

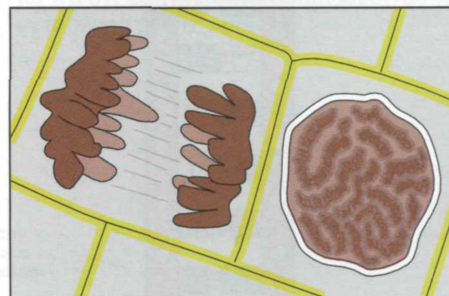
Cząsteczka DNA zawiera dwa komplementarne łańcuchy polinukleotydowe

Biologom w latach czterdziestych dwudziestego wieku trudno było zaakceptować DNA jako materiał genetyczny ze względu na prostotę jego składu chemicznego. DNA wyobrażano sobie po prostu jako długi polimer, zbudowany tylko z czterech rodzajów jednostek monomerycznych, wzajemnie do siebie bardzo podobnych pod względem chemicznym. We wczesnych latach pięćdziesiątych DNA po raz pierwszy analizowano za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich, to jest za pomocą techniki wykorzystywanej do określania przestrzennej struktury cząsteczek (patrz panel 5-5, s. 162–163). Wyniki tej analizy pokazały, że DNA składa się z dwóch helikalnie zwiniętych nici. Stwierdzenie, że DNA jest dwuniciowy, miało zasadnicze znaczenie. Zawierało ono jedną z podstawowych wskazówek, które w 1953 r. doprowadziły do przedstawienia poprawnego modelu budowy DNA. Po zaproponowaniu modelu struktury DNA przez Watsona i Cricka natychmiast stało się jasne, w jaki sposób może zachodzić replikacja DNA i jak może być w nim zakodowana informacja.

Cząsteczka DNA składa się z dwóch długich polinukleotydów, zbudowanych z czterech rodzajów nukleotydów, a określanych jako *łańcuchy* lub jako *nici* DNA. Łańcuchy te są ze sobą związane *wiązaniami wodorowymi* (patrz panel 2-7, s. 70–71) tworzonymi między zasadami wchodzącymi w skład nukleotydów (rys. 6-4). Jak przedstawiono w rozdz. 2 (panel 2-6, s. 66–67), nukleotydy są to związki zbudowane z pięciowęglowego cukru, do którego przyłączona jest reszta fosforanowa oraz zasada azotowa.

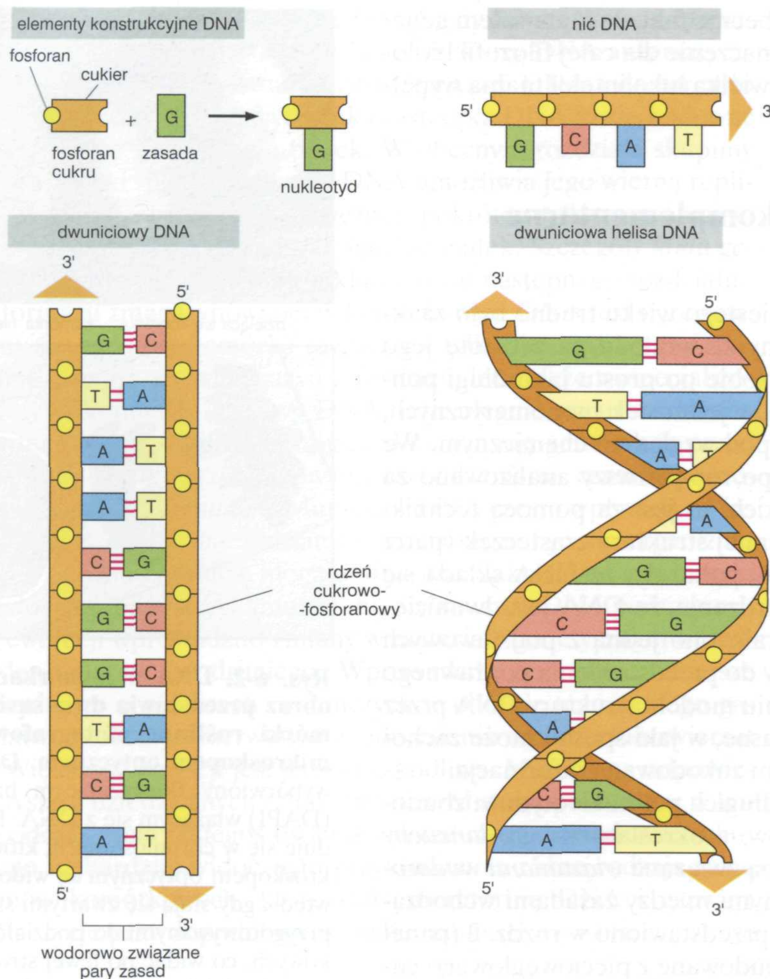






Rys. 6-2. DNA w komórkach. Górny obraz przedstawia dwie sąsiednie komórki roślinne sfotografowane pod mikroskopem optycznym. DNA został wybarwiony fluoryzującym barwnikiem (DAPI) wiążącym się z DNA. DNA znajduje się w chromosomach, które pod mikroskopem optycznym są widoczne tylko wtedy, gdy stają się zwartymi strukturami przygotowywanymi do podziałów komórkowych, co widać po lewej stronie rysunku. Nie dzieląca się komórka, widoczna po prawej stronie, zawiera identyczne chromosomy, ale w tej fazie cyklu życiowego komórki nie są one widoczne pod mikroskopem optycznym, ponieważ znajdują się w znacznie bardziej rozciągniętej konformacji. Schematyczny zarys obu komórek, podkreślający stan ich DNA, przedstawiono w dolnej części rysunku. (Dzięki uprzejmości: Peter Shaw)

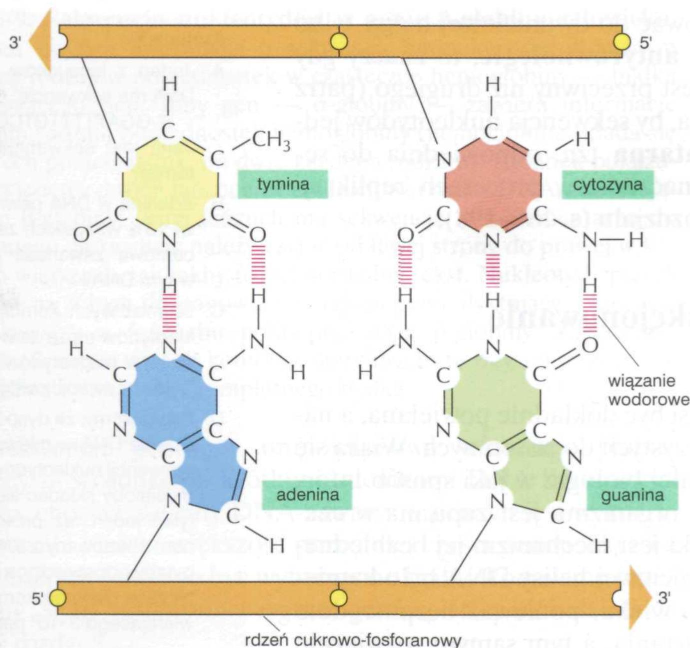
Rys. 6-3. Eksperymentalne dowody, że DNA jest materiałem genetycznym. Dwa ściśle spokrewnione szczepy bakterii *Streptococcus pneumoniae* różnią się wyglądem i patogennością. Jeden szczep wydaje się gładki (S) i powoduje śmierć zainfekowanej myszy, a drugi szczep jest szorstki (R) i nie wywołuje objawów letalnych. Doświadczenie na rysunku (A) pokazuje, że substancja zawarta w szczepie S może zmienić (czyli dokonać transformacji) szczep R w szczep S i że zmiana ta jest dziedziczona przez następne pokolenia bakterii. Doświadczenie na rysunku (B) identyfikuje tę subtancję jako DNA



Rys. 6-4. DNA i jego elementy składowe. DNA składa się z czterech typów nukleotydów kowalencyjnie połączonych w łańcuchy polinukleotydowe zawierające rdzeń cukrowo-fosforanowy, do którego są przyłączone zasady (A, C, G i T). Cząsteczka DNA składa się z dwóch łańcuchów polinukleotydowych (nici DNA) połączonych wiązaniami wodorowymi między zasadami tworzącymi pary. *Strzałki* przy niciach DNA wskazują ich polarność; dwa łańcuchy w cząsteczce DNA biegną antyrównolegle. U dołu po lewej stronie przedstawiono DNA w postaci rozprostowanej; w rzeczywistości jest on skręcony w dwuniciową helisę, jak pokazano po prawej

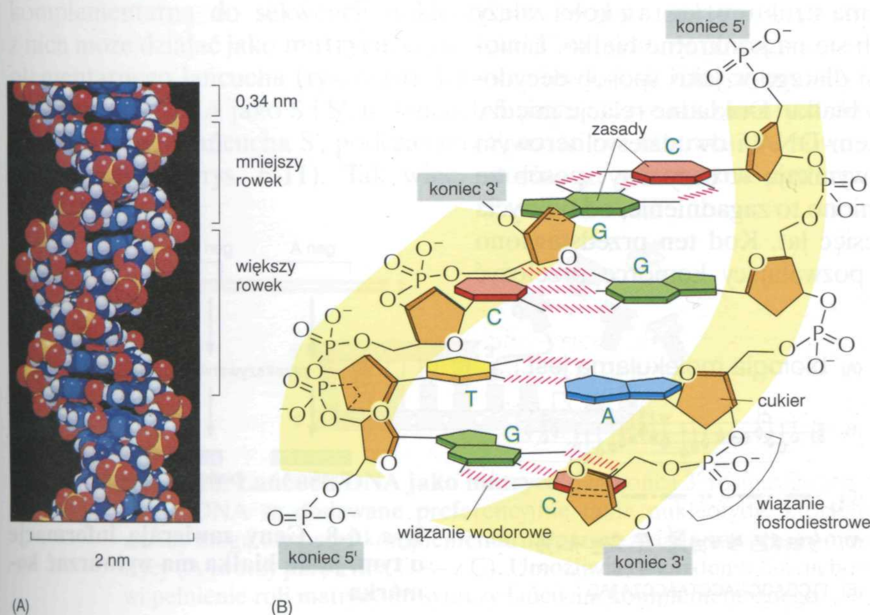
W przypadku nukleotydów w DNA cukrem jest deoksyryboza (stąd nazwa: kwas deoksyrybonukleinowy) związana z resztą monofosforanową oraz z *adeniną* (A), *cytozyną* (C), *guaniną* (G) lub *tyminą* (T). Nukleotydy są ze sobą połączone wiązaniami kowalencyjnymi w długie łańcuchy przez cukry i fosforany, co prowadzi do utworzenia się ich rdzenia, zawierającego na przemian reszty cukrowe i fosforanowe (rys. 6-4). Ponieważ poszczególne nukleotydy w pojedynczym łańcuchu DNA różnią się tylko zasadami, można go sobie wyobrazić jako rozciągnięty naszyjnik (rdzeń), zbudowany z jednakowych, powtarzających się ogniw, z których każde jest związane z jednym z czterech różnych wisiorków (zasady A, C, G lub T). Te same symbole (jednoliterowe skróty nazw) są powszechnie stosowane także do określania czterech różnych nukleotydów, to jest zasad związanych z cukrem i resztą fosforanową.

Sposób łączenia się nukleotydów nadaje łańcuchom DNA chemiczną polarność. Jeśli wyobrazimy sobie, że każdy nukleotyd na jednym końcu zawiera kulkę (fosforan), a na drugim pasujące do niej wgłębienie, to łańcuch, powstający przez dopasowanie kulki jednego elementu do wgłębienia na końcu drugiego, będzie ciągiem takich elementów, zawsze jednakowo zwróconych. Dwa końce łańcucha można łatwo odróżnić, gdyż na jednym z nich będzie się znajdowała kulka, a na drugim — zagłębienie. Polarność budowy łańcucha DNA zaznacza się określając jeden z jego końców jako koniec 3' a drugi — jako koniec 5'. Konwencja nazywania końców wynika ze sposobu łączenia się nukleotydów w łańcuchy.



Rys. 6-5. Komplementarne zasady tworzą w helisie DNA pary. Kształt i struktura chemiczna zasad umożliwia efektywne tworzenie się wiązań wodorowych tylko między A i T oraz G i C, w których atomy zdolne do tworzenia wiązań wodorowych (patrz panel 2-1, s. 46–47) mogą się dostatecznie zbliżyć bez zaburzenia helisy DNA. Między A i T tworzą się dwa wiązania wodorowe natomiast między G i C — trzy. Zasady mogą tworzyć takie pary tylko wtedy, gdy łańcuchy polinukleotydowe są ułożone antyrównolegle

Łańcuchy polinukleotydowe w **dwuniciowej helisie** DNA są związane wiązaniami wodorowymi, które tworzą się pomiędzy zasadami należącymi do przeciwległych łańcuchów. Dlatego też zasady są ulokowane wewnątrz helisy, a łańcuch cukrowo-fosforanowy na zewnątrz (patrz rys. 6-4). Zasady nie tworzą przypadkowych par: A zawsze tworzy parę z T, a G z C (rys. 6-5). W każdym przypadku większa — dwupierścieniowa zasada (puryna, patrz rozdz. 2) tworzy parę z zasadą jednopierścieniową (pirymidyną). Ta reguła *komplementarności* umożliwia utworzonym **parom zasad** ułożenie się wewnątrz dwuniciowej helisy, co jest najkorzystniejsze pod względem energetycznym. Każda z par, mając jednakową szerokość, utrzymuje łańcuch cukrowo-fosforanowy w jednakowej odległości od osi helisy wzdłuż całej jej długości. Dwa łańcuchy tworzące helisę wzajemnie się oplatają (rys. 6-6).



Rys. 6-6. Dwuniciowa helisa DNA. (A) Model czaszowy pokazujący półtora obrotu dwuniciowej helisy DNA. Wzajemne oplatanie się dwóch łańcuchów wytwarza w helisie dwa rowki. Jak zaznaczono, jeden z nich określamy jako większy rowek, drugi jako mniejszy rowek. (B) Krótki wycinek dwuniciowej helisy widzianej z boku. Przedstawiono cztery pary zasad. Nukleotydy są połączone wiązaniami fosfodiestrowymi między grupą 3'-hydroksylową jednego nukleotydu a 5'-fosforanem następnego. Dzięki temu każdy łańcuch polinukleotydowy wykazuje chemiczną polarność, tzn. jego końce są chemicznie różne. Koniec 3' zawiera wolną grupę OH połączoną z węglem 3' pierścienia cukrowego; koniec 5' zawiera wolny fosforan połączony w pozycji 5' z pierścieniem cukru

Każda z par zasad może dobrze pasować do dwuniciowej helisy tylko wtedy, gdy łańcuchy tworzące helisę są **antyrównoległe**, to znaczy gdy zwrot polarności jednego z łańcuchów jest przeciwny niż drugiego (patrz rys. 6-4). Tworzenie się par zasad wymaga, by sekwencja nukleotydów jednego łańcucha była ściśle **komplementarna** tzn. odpowiednia do sekwencji drugiego. Ma to zasadnicze znaczenie w procesach replikacji DNA, o czym traktuje następna część rozdziału (s. 189–198).

Pytanie 6-1

A. Jeden z łańcuchów dwuniciowej helisy DNA ma sekwencję: 5'-GGATTTTTGTCCACAATCA-3'. Jaka jest sekwencja nici komplementarnej?

B. Adenina w DNA pewnych bakterii stanowi 13% wszystkich zasad. Jaka jest procentowa zawartość pozostałych zasad w tym DNA?

C. Ile możliwych kombinacji sekwencji nukleotydów może zawierać odcinek o długości *N* nukleotydów: a) jednoniciowego DNA, b) dwuniciowego DNA?

D. Przypuśćmy, że dysponujesz metodą rozcinania DNA w miejscach o specyficznej sekwencji nukleotydów. Z ilu nukleotydów musiałoby składać się takie miejsce, aby tylko jeden raz przeciąć bakteryjny genom zbudowany z $3 \cdot 10^6$ par zasad? Jaka byłaby odpowiedź na to samo pytanie dotyczące genomu komórki zwierzęcej, zawierającego $3 \cdot 10^9$ par zasad?

Struktura DNA umożliwia funkcjonowanie mechanizmów dziedziczenia

Geny są nośnikami informacji, która musi być dokładnie powielana, a następnie przekazywana z komórek macierzystych do potomnych. Wiążą się z tym dwa problemy, podstawowe dla całej biologii: w jaki sposób informacja decydująca o wszystkich cechach organizmu jest zapisana w chemicznej strukturze jakiegoś związku i jaki jest mechanizm jej bezbłędnego powielania? Odkrycie struktury dwuniciowej helisy DNA było kamieniem milowym w biologii dwudziestego wieku, ponieważ bezpośrednio sugerowało odpowiedzi na obydwa te pytania, a tym samym rozwiązało też problem dziedziczenia na poziomie molekularnym. Zanim szczegółowo omówimy odpowiedź na drugie z tych pytań, przedstawimy zarys odpowiedzi na pytanie pierwsze.

Informacja w DNA jest zakodowana w kolejności ułożenia czyli sekwencji nukleotydów w każdym z dwóch łańcuchów. Każdą zasadę — A, C, T lub G można traktować jako litery czteroliterowego alfabetu używanego do zapisania biologicznych informacji w chemicznej strukturze DNA (rys. 6-7). Organizmy różnią się między sobą, ponieważ zawarte w nich cząsteczki DNA mają różne sekwencje nukleotydowe i w konsekwencji zawierają różną informację biologiczną. W jaki jednak sposób alfabet nukleotydowy jest wykorzystywany do zapisywania informacji i jaka jest jej istota?

Przed określeniem struktury DNA było już wiadomo, że geny zawierają instrukcje dotyczące wytwarzania białek (rys. 6-8). Informacje zawarte w DNA muszą dlatego w jakiś sposób decydować o syntezie białka. Problem można łatwiej zrozumieć, gdy uwzględnimy chemiczny charakter białek. Jak przedstawiono w rozdz. 5, właściwości białek warunkujące funkcje biologiczne są określane przez przestrzenną strukturę, która z kolei zależy od sekwencji aminokwasów, składających się na konkretne białko. Liniowa sekwencja nukleotydów w genie musi dlatego w jakiś sposób decydować o liniowej sekwencji aminokwasów w białku. Dokładne relacje między czteroliterowym nukleotydowym alfabetem DNA i dwudziestoliterowym alfabetem aminokwasowym białek nie wynikają w oczywisty sposób ze struktury DNA, i zanim dokładnie wyjaśniono to zagadnienie, od odkrycia dwuniciowej helisy upłynęło ponad dziesięć lat. Kod ten przedstawiono w rozdz. 7, podobnie jak mechanizm pozwalający komórce przełożyć

(A) biologia molekularna jest.....

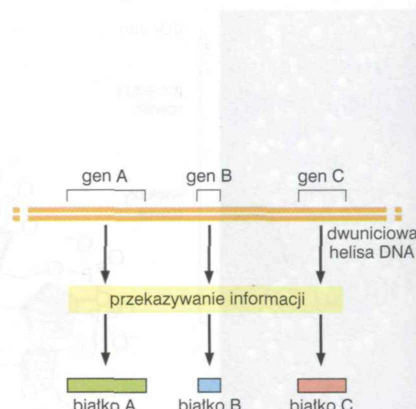
(B) [zapis muzyczny]

(C) ·▬ ·▬·· ·· ▬·▬· ·

(D) 细胞生物学乐趣无穷

(E) TTCGAGCGACCTAACCTATAG

Rys. 6-7. Przykłady informacji liniowych. Zastosowano (od góry): język polski, zapis muzyczny, zapis alfabetem Morse'a, język chiński, język DNA



Rys. 6-8. Geny zawierają informacje o tym, jakie białka ma wytwarzać komórka

Rys. 6-9. Sekwencja nukleotydów w genie β-globiny człowieka. Ten gen zawiera informacje o sekwencji aminokwasów w jednym z dwóch rodzajów podjednostek w cząsteczce hemoglobiny — białka przenoszącego tlen. Inny gen — α-globiny — zawiera informacje o drugim rodzaju podjednostek hemoglobiny (hemoglobina składa się z czterech podjednostek, po dwie każdego rodzaju). Rysunek pokazuje tylko jeden z dwóch łańcuchów dwuniciowej helisy DNA, zawierający gen β-globiny; drugi łańcuch ma sekwencję komplementarną do pokazanego. Sekwencję należy czytać od lewej strony do prawej w kolejnych wierszach, tak jakby to był normalny tekst. Nukleotydy przedstawione na żółtym tle stanowią trzy rejony genu, dyktujące sekwencję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym β-globiny. Zobaczymy w rozdz. 7, w jaki sposób komórka łączy razem te trzy sekwencje, tak by możliwa była synteza kompletnego białka

```
CCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCA
ATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAG
CCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAG
CCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACAC
AACTGTGTTCACTAGCAACTCAAACAGACA
CCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGT
CTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGA
ACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG
GCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGT
TTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTG
GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATA
GGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTAT
TTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTAC
CCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTT
GGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATG
GGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAG
AAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTG
GCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAG
CTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTG
AGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCC
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCAT
AGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTT
AGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCA
GTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTC
TTTTATTTGCTGTTCATAACAATTGTTTTC
TTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTT
CTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAA
TGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAA
TATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAA
AAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATT
ACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGC
ATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTT
TTATTTTTAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAA
TATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGT
AATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCT
TTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATC
TTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTC
TTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCAT
GCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAG
TGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAAT
ATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAA
ATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTG
CTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTC
TGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTG
GATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCT
CCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTG
TGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATT
CACCCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAA
AGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGC
CCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGC
TGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTT
CCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATA
TTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTG
CCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA
TGATGTATTTAAATTATTTCTGAATATTTT
ACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAGTGCA
TTTAAAACATAAAGAAATGATGAGCTGTTC
AAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAA
CTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAACCAG
CTAATGCACATTGGCAACAGCCCCTGATGC
CTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGAT
TCTTGTAGAGGCTTGATTTGCAGGTTAAAG
TTTTGCTATGCTGTATTTTACATTACTTAT
TGTTTTAGCTGTCCTCATGAATGTCTTTTC
```

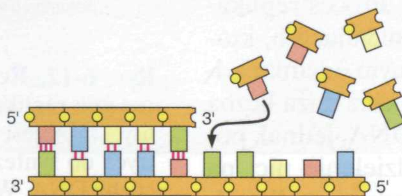
nukleotydową sekwencję genu na aminokwasową sekwencję białka. W większości geny są stosunkowo krótkimi odcinkami DNA kodującymi pojedyncze białko, chociaż nie cały DNA zawarty w genach jest wykorzystywany do kodowania białek: większość pozostałej części genów określa, kiedy i w jakich ilościach powinno być wytworzone białko kodowane przez poszczególne geny. Są to *regulatorowe regiony* genów, ich sposób działania przedstawiono w rozdz. 8.

Kompletny zasób informacji w DNA jakiegoś organizmu nazywa się jego **genomem** (terminem tym określa się także DNA, który tę informację zawiera). Ilość tych informacji jest oszałamiająca: typowa komórka ludzka zawiera DNA o długości ok. 1 m ($3 \cdot 10^9$ nukleotydów). Zapis sekwencji nukleotydowej małego genu człowieka, przedstawiony w formie czteroliterowego alfabetu, zajmuje ćwierć strony tekstu (rys. 6-9), natomiast zapis sekwencji całego genomu człowieka zająłby ponad tysiąc tomów wielkości tej książki.

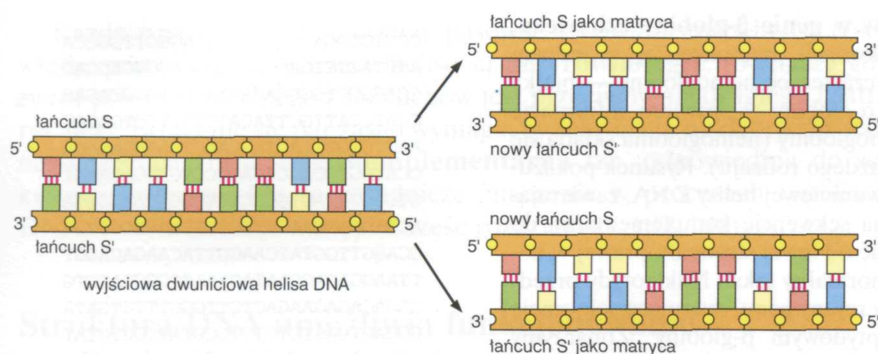
Przy każdym podziale komórka musi skopiować swój genom tak, by mogła przekazać go do obu komórek potomnych. Struktura DNA ujawniła także podstawy jego powielania.

Replikacja DNA

Ponieważ każdy łańcuch DNA ma sekwencję nukleotydów dokładnie komplementarną do sekwencji nukleotydów swojego partnera, każdy z nich może działać jako **matryca**, czyli „forma" do syntezy nowego komplementarnego łańcucha (rys. 6-10). Innymi słowy, jeśli oznaczymy obydwa łańcuchy DNA jako S i S', to łańcuch S może służyć jako matryca do syntezy nowego łańcucha S', podczas gdy S' może być matrycą dla nowego łańcucha S (rys. 6-11). Tak więc informacja genetyczna zawarta



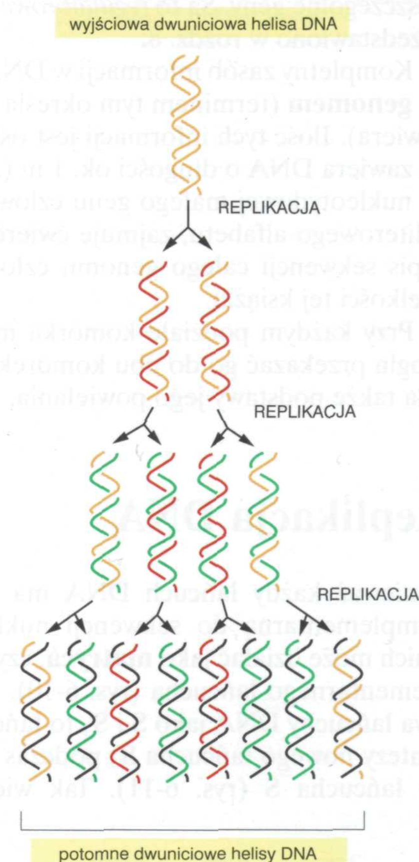
Rys. 6-10. Łańcuch DNA jako matryca. Do końca 3' rosnącego łańcucha DNA są dodawane preferencyjnie takie nukleotydy, których zasady mogą utworzyć komplementarną parę z zasadą zawartą w matrycy (A tworzy parę z T, a G — z C). Umożliwia to każdemu łańcuchowi pełnienie roli matrycy do syntezy łańcucha komplementarnego



Rys. 6-11. DNA działa jako matryca dla swojej własnej replikacji. Ponieważ nukleotyd A może utworzyć poprawną parę tylko z T, a G z C, każdy łańcuch DNA dyktuje sekwencję nukleotydów łańcucha komplementarnego. Dwuniciowa helisa DNA może dzięki temu ulegać precyzyjnemu powielaniu

w DNA może być dokładnie powielana w zachwycająco prostym procesie, w którym łańcuch S oddziela się od S' i każdy z nich oddzielnie służy jako matryca do wytworzenia nowego komplementarnego, partnerskiego łańcucha o sekwencji identycznej do swego pierwszego partnera.

Zdolność każdego z łańcuchów cząsteczki DNA do funkcjonowania w roli matrycy podczas tworzenia łańcucha komplementarnego umożliwia komórce replikację swoich genów przed przekazaniem ich komórkom potomnym. Zadanie to jednak jest przerażająco ogromne, gdyż polega na kopiowaniu miliardów par nukleotydów przed każdym podziałem komórkowym. Musi być ono przeprowadzone szybko i dokładnie. Dzieląca się komórka zwierzęca musi w ciągu ośmiu godzin skopiować ilość informacji równoważną tysiącu książek takich jak ta i nie wprowadzić przy tym jednej lub dwóch błędnych liter. Wyczynu tego dokonuje zespół białek nazywany *aparatem replikacyjnym*. **Replikacja DNA** polega na syntezie dwóch kompletnych dwuniciowych helis z jednej wyjściowej, przy czym obydwie nowe helisy mają sekwencję nukleotydową identyczną (z wyjątkiem rzadko występujących błędów) z helisą wyjściową (patrz rys. 6-11). Ponieważ każdy łańcuch macierzystej cząsteczki DNA służy jako matryca do syntezy jednego nowego łańcucha, każda z potomnych dwuniciowych helis DNA zawiera jeden łańcuch stary (wyjściowy) oraz jeden nowy (rys. 6-12).



Rys. 6-12. Replikacja DNA. W każdej rundzie replikacji każda z dwóch nici helisy DNA jest wykorzystywana jako matryca do syntezy komplementarnego łańcucha DNA. Wyjściowe (rodzicielskie) nici pozostają przeto nienaruszone w wielu pokoleniach komórek. Replikacja DNA jest semikonserwatywna dlatego, że każda potomna dwuniciowa helisa zawiera jeden stary łańcuch i jeden łańcuch nowo zsyntetyzowany

Synteza DNA rozpoczyna się w określonych miejscach początku replikacji

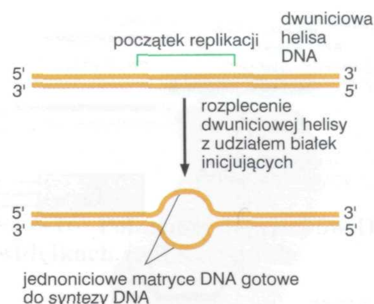
Dwuniciowa helisa DNA normalnie jest bardzo stabilna: obydwie nici są ściśle połączone licznymi wiązaniami wodorowymi między zasadami obu łańcuchów (patrz rys. 6-4). Mogą one ulec zerwaniu przez energię termiczną, ale dopiero wtedy, gdy temperatura roztworu zbliża się do temperatury wrzenia wody. Żeby jednak pełnić funkcje matrycy, dwuniciowa helisa DNA musi być uprzednio rozpleciona, tak by każdy z łańcuchów mógł eksponować niesparowane zasady (patrz rys. 6-10). Proces replikacji zaczyna się dlatego od związania przez DNA białek inicjujących, które zrywają wiązania wodorowe między zasadami i na pewnym odcinku oddzielają od siebie obydwa łańcuchy DNA (rys. 6-13). Chociaż duża liczba wiązań wodorowych w sumie zapewnia stabilność helisy DNA, jednak pojedyncze wiązania wodorowe są słabe (rozdz. 2). Rozdzielenie nici na krótkim odcinku DNA nie wymaga dlatego dużego nakładu energii i odbywa się z udziałem białek inicjujących w normalnej temperaturze.

Odcinki DNA, w których w procesie replikacji zostaje zainicjowane rozplatanie dwuniciowej helisy, są nazywane miejscami **początku replikacji**, lub w skrócie miejscami **ori** (ang. origin — początek) (patrz rys. 6-13). Miejsca te zawierają szczególne sekwencje nukleotydów.

W komórkach prostych organizmów, takich jak bakterie lub drożdże, miejsca początku replikacji obejmują odcinki DNA o długości ok. 100 par zasad. Zawierają one sekwencje, z którymi łatwo wiążą się białka inicjujące, oraz takie, w których łatwo zachodzi rozplecenie struktury dwuniciowej. Jak przedstawiono na rys. 6-5, para zasad A·T jest związana mniejszą ilością wiązań wodorowych, niż para G·C. Z tego powodu odcinki DNA bogate w pary A · T stosunkowo łatwo ulegają rozpleceniu i takie właśnie odcinki są typowe dla miejsc początku replikacji.

Typowy genom komórki bakteryjnej — kolista cząsteczka DNA zbudowana z kilku milionów par zasad — ma jedno miejsce początku replikacji. Wielokrotnie większy genom człowieka zawiera około 10 000 takich miejsc. Umożliwia to komórkom ludzkim rozpoczęcie replikacji DNA równocześnie w wielu miejscach i stosunkowo szybki jej przebieg.

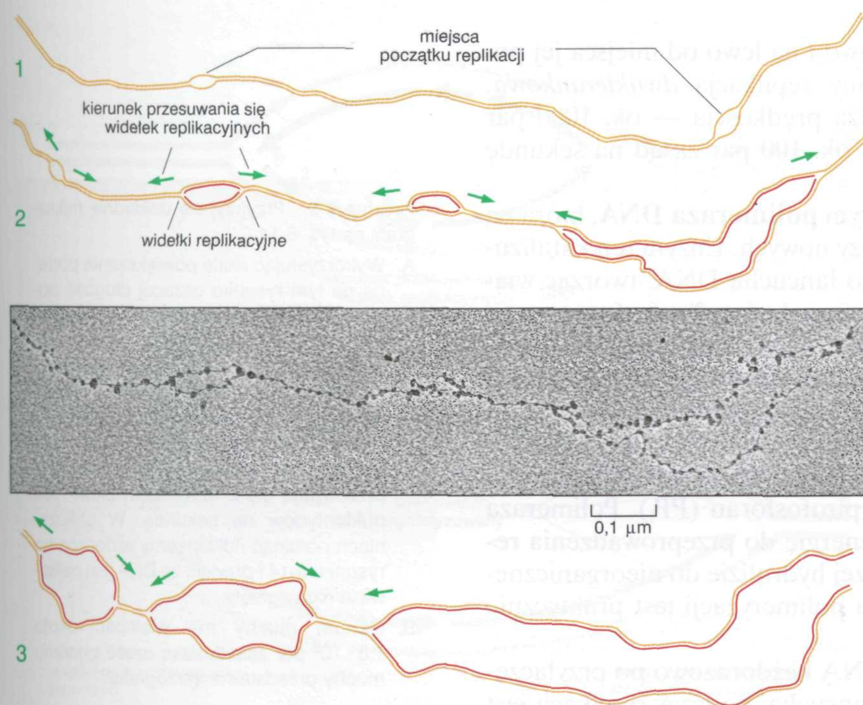
Związanie się białek inicjujących z miejscem *ori* i lokalne rozplecenie dwuniciowej helisy DNA umożliwia następne związanie całej grupy białek, które dokonują replikacji DNA. Białka te współdziałają ze sobą tworząc kompletny aparat, którego poszczególne elementy pełnią określone, specyficzne funkcje. Białka te pokrótce zostaną przedstawione po zarysowaniu tego, co podczas replikacji dzieje się z DNA.



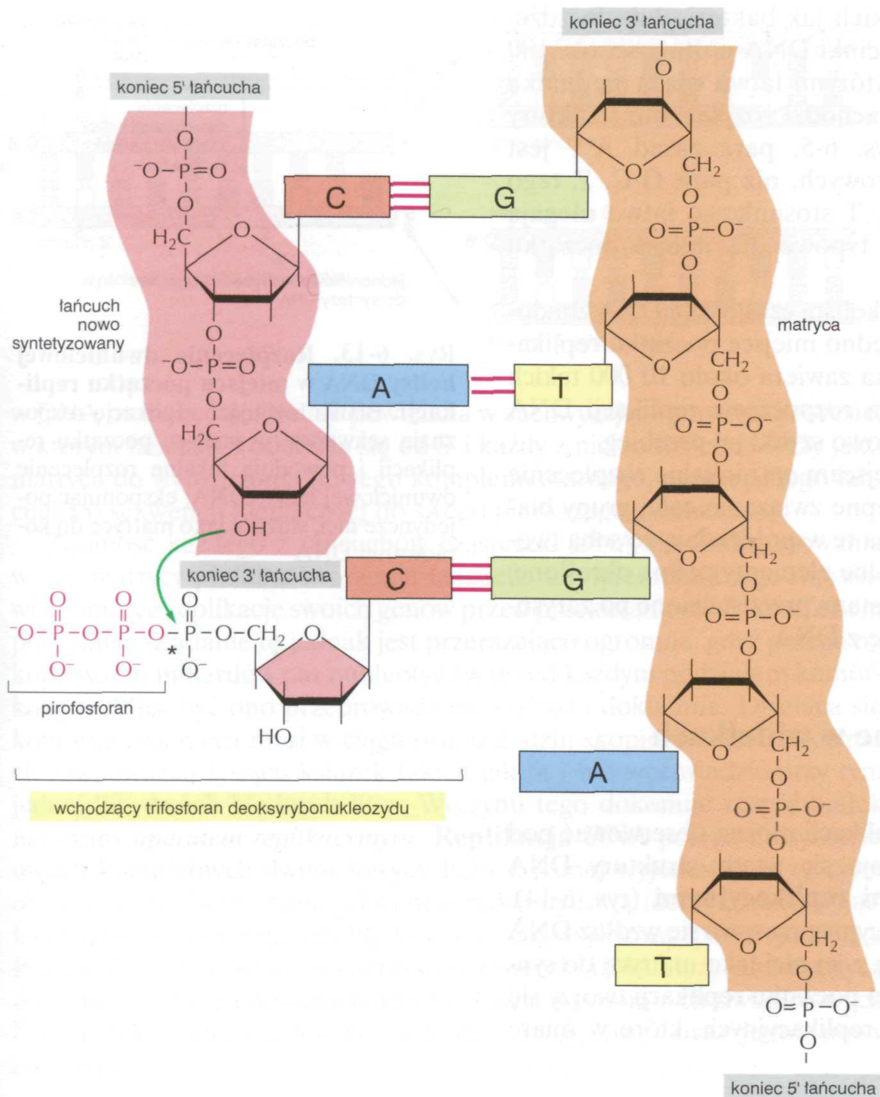
Rys. 6-13. Rozplecenie dwuniciowej helisy DNA w miejscu początku replikacji. Białka inicjujące replikację rozpoznają sekwencje w miejscu początku replikacji i powodują lokalne rozplecenie dwuniciowej helisy DNA, eksponując pojedyncze nici, służące jako matryce do kopiowania DNA

Nowe łańcuchy DNA są tworzone w widełkach replikacyjnych

Cząsteczki DNA przyłapane w trakcie replikacji można obserwować pod mikroskopem elektronowym. Uwidaczniają się wtedy struktury DNA o kształcie litery Y, nazywane **widełkami replikacyjnymi** (rys. 6-14). W widełkach replikacyjnych aparat replikacyjny przesuwa się wzdłuż DNA i po rozpleceniu helisy wykorzystuje każdą z jej nici jako matrycę do syntezy nowych łańcuchów. W każdym miejscu początku replikacji tworzy się para przeciwnie zorientowanych widełek replikacyjnych, które w miarę



Rys. 6-14. Widełki replikacyjne przesuwają się w obu kierunkach od miejsc początku replikacji, które w chromosomie eukariotycznym powtarzają się wielokrotnie. Mikrografia elektronowa pokazuje replikujący DNA we wczesnym stadium rozwojowym zarodka muchy. Cząstki widoczne wzdłuż DNA to nukleosomy — struktury charakterystyczne dla chromosomów eukariotycznych, złożone z białkowego rdzenia i nawiniętego na nim odcinka DNA (patrz rozdział 8). (1), (2), (3) Szkice kolejnych etapów replikacji, jakie można sobie wyobrazić na podstawie mikrografii. (2) jest rysunkiem odpowiadającym mikrografii. *Żółte linie* — wyjściowe łańcuchy DNA, *czerwone linie* — łańcuchy nowo zsyntetyzowane (Mikrografia elektronowa dzięki uprzejmości: Viktoria Foe)



Rys. 6-15. Synteza DNA. Przyłączanie deoksyrybonukleotydu do grupy hydroksylowej na końcu 3' łańcucha polinukleotydowego jest podstawową reakcją syntezy DNA. Nowy łańcuch DNA wydłuża się w kierunku od końca 5' do końca 3'. Kolejność wbudowywania nowych nukleotydów do rosnącego łańcucha dyktują nukleotydy w matrycy, z którymi nowo wchodzące muszą utworzyć komplementarne pary (patrz rys. 6-10). Przyłączanie nukleotydów katalizuje enzym, polimeraza DNA. Substratami reakcji są trifosforany deoksyrybonukleozydów. Zerwanie wiązania fosfobezwodnikowego (zaznaczonego gwiazdką) w trifosforanie nukleozydu, który wchodzi w reakcję, uwalnia dużą ilość swobodnej energii, wykorzystywanej do reakcji polimeryzacji

przebiegu replikacji przesuwają się na prawo i na lewo od miejsca jej początku. Proces ten jest dlatego nazywany replikacją *dwukierunkową*. Widełki replikacyjne przesuwają się z dużą prędkością — ok. 1000 par zasad na sekundę w przypadku bakterii i ok. 100 par zasad na sekundę w komórkach człowieka.

Sercem aparatu replikacyjnego jest enzym **polimeraza DNA**, która na matrycy starych nici DNA dokonuje syntezy nowych. Enzym ten katalizuje przyłączanie nukleotydów do rosnącego łańcucha DNA, tworząc wiązania fosfodiestrowe między grupą OH na jego końcu 3' a fosforanem na końcu 5' nowo wchodzącego nukleotydu (rys. 6-15). Nukleotydy wchodzą w reakcję w postaci bogatych w energię trifosforanów nukleozydów, dostarczających energii niezbędnej do napędzania polimeryzacji. Hydroliza jednego wiązania fosfobezwodnikowego trifosforanu nukleozydu dostarcza energii do reakcji kondensacji, w czasie której monomeryczny nukleotyd łączy się z łańcuchem i uwalnia pirofosforan (PP_i). Polimeraza DNA wykorzystuje uwolnioną przy tym energię do przeprowadzenia reakcji kondensacji. Pirofosforan ulega dalszej hydrolizie do nieorganicznego fosforanu (P_i), co decyduje, że reakcja polimeryzacji jest praktycznie nieodwracalna (patrz rys. 3-35).

Polimeraza DNA nie odłącza się od DNA każdorazowo po przyłączeniu kolejnego nukleotydu do rosnącego łańcucha; podczas replikacji jest

Pytanie 6-2. Przyjrzyj się dokładnie mikrografii na rys. 6-14.

A. Wykorzystując skalę powiększenia podaną na tym rysunku oszacuj długość odcinków DNA między widełkami replikacyjnymi. Numerując widełki replikacyjne kolejno od strony lewej oblicz czas, po jakim doszłoby do kolizji pomiędzy widełkami # 4 i # 5 oraz # 6 i # 7. Odległość między zasadami w DNA wynosi 0,34 nm, a eukariotyczne widełki replikacyjne przesuwają się z szybkością około 100 nukleotydów na sekundę. W obliczeniach pominąć nukleosomy widoczne na rysunku 6-14 i przyjąć, że DNA jest całkowicie rozciągnięty.

B. Genom muchy ma wielkość około $1{,}8 \cdot 10^8$ par zasad. Jaką część genomu muchy przedstawia mikrografia?

ona ciągle zasocjowana z DNA, wzdłuż którego przesuwa się etapami przez wiele cykli reakcji polimeryzacji. W dalszej części tego rozdziału przedstawimy, jak specjalne białko utrzymuje polimerazę w formie związanej z DNA.

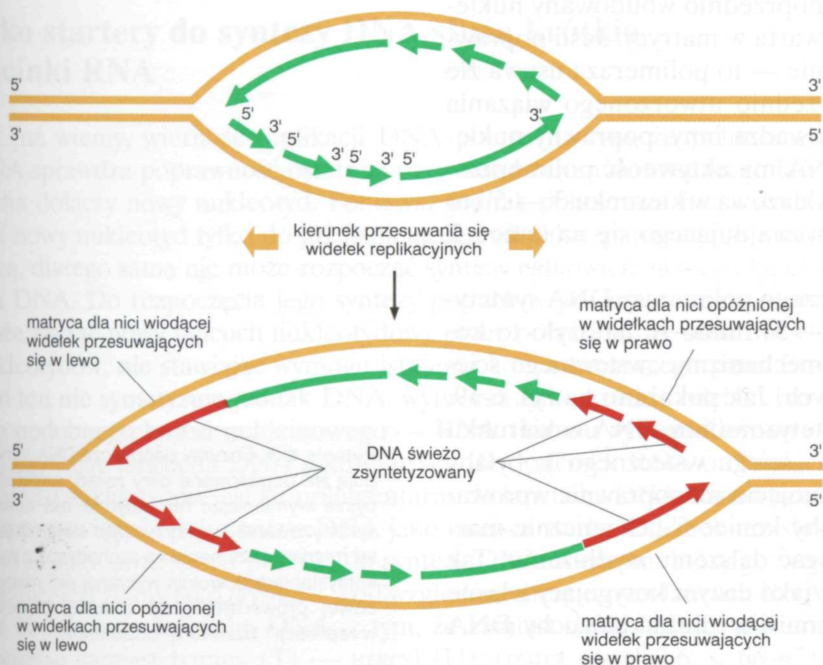


Rys. 6-16. Polarność łańcuchów DNA w widełkach replikacyjnych

Widełki replikacyjne są asymetryczne

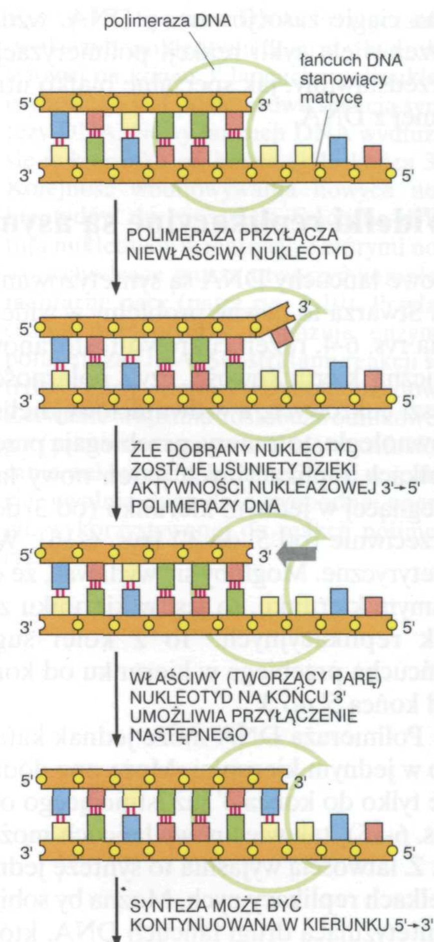
Nowe łańcuchy DNA są syntetyzowane w kierunku od końca 5' do końca 3'. Stwarza to pewne problemy w widełkach replikacyjnych. Jak przedstawia rys. 6-4, rdzeń cukrowo-fosforanowy każdej nici DNA ma swoją chemiczną kierunkowość, czyli polarność, wynikającą ze sposobu łączenia reszt cukrowych, a w dwuniciowej helisie łańcuchy DNA są ułożone antyrównolegle, to znaczy, przebiegają przeciwnie. W konsekwencji tego w widełkach replikacyjnych jeden nowy łańcuch DNA powstaje na matrycy biegnącej w jednym kierunku (od 3' do 5'), a drugi na matrycy zwróconej przeciwnie (od 5' do 3') (rys. 6-16). Widełki replikacyjne są dlatego asymetryczne. Mogłoby się wydawać, że obydwa nowe łańcuchy rosną w tym samym kierunku, to jest w kierunku zgodnym z kierunkiem ruchu widełek replikacyjnych. To z kolei sugerowałoby, że synteza jednego łańcucha przebiega w kierunku od końca 3' do 5', a drugiego w kierunku od końca 5' do 3'.

Polimeraza DNA może jednak katalizować wzrost łańcucha DNA tylko w jednym kierunku. Może ona dodawać nowe jednostki monomeryczne tylko do końca 3' już istniejącego odcinka kwasu nukleinowego (patrz rys. 6-15), tak więc nowy łańcuch może rosnąć tylko w kierunku od 5' do 3'. Z łatwością wyjaśnia to syntezę jednej z dwóch nici powstających w widełkach replikacyjnych. Można by sobie wyobrazić inną polimerazę DNA, syntetyzującą drugi łańcuch DNA, która doczepia nowe jednostki monomeryczne do końca 5' rosnącego łańcucha, ale taki enzym nie istnieje. Problem ten został rozwiązany przez manewr „wstecznego ściegu". Łańcuch DNA, którego koniec 5' jest pozornie wydłużany, rośnie w sposób *nieciągły* w postaci oddzielnych krótkich odcinków, syntetyzowanych



Rys. 6-17. Asymetria widełek replikacyjnych. Ponieważ obydwa nowe łańcuchy są syntetyzowane w kierunku 5' → 3', opóźniona nić DNA powstaje z początku w postaci krótkich odcinków DNA, ulegających później kowalencyjnemu połączeniu. Schemat w górnej części rysunku przedstawia parę widełek replikacyjnych, przesuwających się w przeciwnych kierunkach; schemat w dolnej części pokazuje te same widełki po jakimś czasie. Na nici opóźnionej polimeraza DNA pozornie cofa się: musi syntetyzować krótkie fragmenty (nazywane fragmentami Okazaki) w kierunku 5' do 3', a następnie przesunąć się wzdłuż matrycy w przeciwnym kierunku (to jest w kierunku widełek), by syntetyzować następny fragment

Rys. 6-18. Polimeraza DNA sprawdza produkt powstający podczas replikacji. Jeśli do rosnącego łańcucha DNA zostanie przyłączony niewłaściwy nukleotyd, to polimeraza DNA usuwa go, zastępuje poprawnym i dopiero potem kontynuuje wydłużanie łańcucha



przez polimerazę DNA w kierunku od końca 5' do 3', pozornie wstecz w stosunku do widełek replikacyjnych. Poszczególne odcinki są następnie łączone, dając kowalencyjnie ciągły nowy łańcuch (rys. 6-17). Łańcuch DNA syntetyzowany w sposób nieciągły nazywamy **nicią opóźnioną**, łańcuch syntetyzowany w sposób ciągły — **nicią wiodącą**.

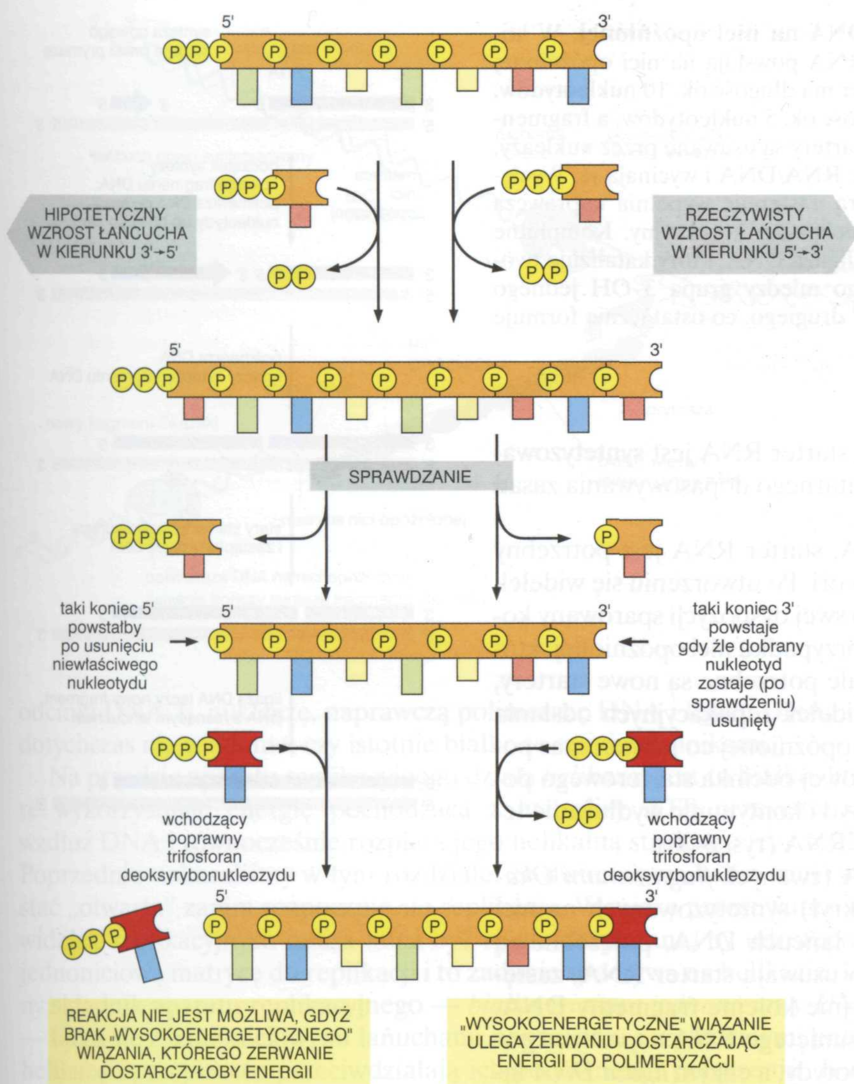
Chociaż różne w szczegółach, widełki replikacyjne wszystkich komórek, prokariotycznych i eukariotycznych, zawsze mają nici opóźnione i wiodące. Wspólne cechy procesu wynikają z tego, że wszystkie polimerazy DNA mogą syntetyzować łańcuchy DNA wyłącznie w kierunku od końca 5' do 3'. Procesy syntezy nici opóźnionej DNA bardziej szczegółowo omówimy w dalszej części rozdziału, ale najpierw zajmiemy się inną cechą polimeraz DNA, wspólną dla enzymów tej klasy we wszystkich komórkach.

Polimeraza DNA koryguje swoje błędy

Polimeraza DNA jest tak dokładna, że popełnia tylko jeden błąd na 10^7 nukleotydów poprawnie wprowadzonych podczas replikacji. Błąd ten jest znacznie mniejszy, niż można by oczekiwać na podstawie dokładności łączenia się zasad w pary. Chociaż pary A·T i C·G są najbardziej stabilne, jednak mogą tworzyć się pary mniej stabilne, na przykład G·T lub C·A. Takie niepoprawne pary powstają znacznie rzadziej niż pary poprawne, ale tworzą się na tyle często, że mogłyby zabić komórkę, gdyby zakumulowały się w DNA wskutek braku korekty. Komórki jednak unikają takiej katastrofy, ponieważ polimeraza DNA może korygować swoje ewentualne pomyłki. Obok zdolności do katalizowania reakcji polimeryzacji, polimeraza DNA może też dokonywać korekty błędów, co nazywamy **redagowaniem**. Zanim dołączy nowy nukleotyd do rosnącego łańcucha DNA, enzym sprawdza, czy poprzednio wbudowany nukleotyd utworzył poprawną parę z zasadą zawartą w matrycy. Jeśli poprawną, to enzym łączy nowy nukleotyd, jeśli nie — to polimeraza usuwa źle dobrany nukleotyd przez zerwanie poprzednio utworzonego wiązania fosfodiestrowego, a na jego miejsce wprowadza inny, poprawny nukleotyd (rys. 6-18). Tak więc polimeraza DNA ma aktywność polimerazową w kierunku 5' → 3' oraz aktywność nukleazową w kierunku 3' → 5' (to znaczy zdolność do odcinania nukleotydu znajdującego się na końcu 3' łańcucha).

Mechanizm redagowania wyjaśnia, dlaczego polimerazy DNA syntetyzują łańcuchy DNA tylko w kierunku 5' → 3', mimo że nałożyło to konieczność rozwinięcia skomplikowanego mechanizmu „wstecznego ściegu" działającego w widełkach replikacyjnych. Jak pokazano na rys. 6-19, hipotetyczna polimeraza DNA, która syntetyzowałaby DNA w kierunku 3' → 5' (i usuwała potrzebę mechanizmu „ściegu wstecznego"), byłaby niezdolna do dokonywania korekty: po usunięciu niepoprawnie wprowadzonego nukleotydu polimeraza tworzyłaby koniec 5' „chemicznie martwy" w tym sensie, że nie mógłby on ulegać dalszemu wydłużaniu. Tak więc aby polimeraza mogła funkcjonować jako enzym korygujący własne błędy popełnione podczas polimeryzacji, musi wydłużać łańcuchy DNA wyłącznie w kierunku 5' → 3'.

Pytanie 6-3. Enzymy naprawcze DNA korygują źle dopasowane pary zasad, preferencyjnie wymieniając nukleotyd w nici nowo syntetyzowanej i wykorzystując starą nić jako matrycę. Czy naprawa zachodząca z wykorzystaniem dowolnie wybranej nici matrycowej prowadziłaby do redukcji błędów w replikacji? Uzasadnij odpowiedź.

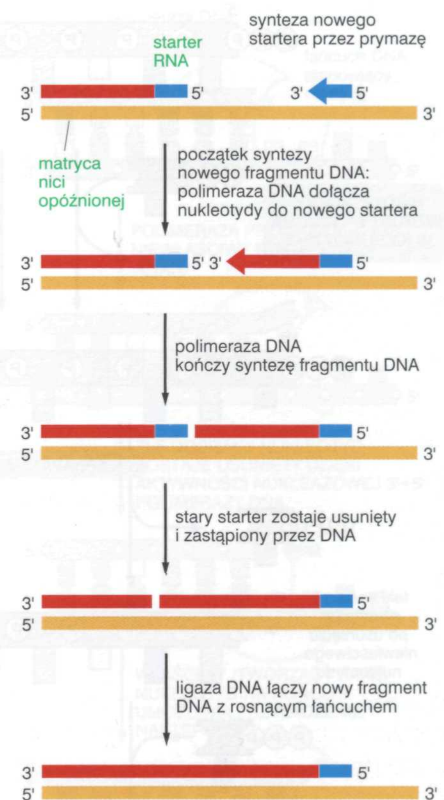


Rys. 6-19. Wyjaśnienie, dlaczego łańcuch DNA rośnie w kierunku 5' → 3'. Wzrost łańcucha w kierunku 5' → 3', przedstawiony po prawej stronie rysunku, umożliwia kontynuowanie wydłużania po ewentualnej korekcie produktu (patrz rys. 6-18). W przypadku hipotetycznej polimeryzacji w kierunku 3' → 5' (lewa strona rysunku) ewentualna korekta prowadziłaby do zablokowania możliwości dalszego wydłużania łańcucha. Dla uproszczenia rysunek przedstawia tylko jedną z dwóch nici helisy

Jako startery do syntezy DNA służą krótkie odcinki RNA

Jak już wiemy, wierność replikacji DNA polega na tym, że polimeraza DNA sprawdza poprawność ostatniej pary zasad zanim do rosnącego łańcucha dołączy nowy nukleotyd. Ponieważ jednak polimeraza może dodawać nowy nukleotyd tylko do już istniejącego odcinka sparowanego z matrycą, dlatego sama nie może rozpocząć syntezy całkowicie nowego łańcucha DNA. Do rozpoczęcia jego syntezy potrzebny jest inny enzym, który może zacząć nowy łańcuch nukleotydowy przez połączenie ze sobą dwóch nukleotydów, nie stawiając wymogu istnienia końca tworzącego parę. Enzym ten nie syntetyzuje jednak DNA, wytwarza tylko krótkie odcinki bardzo podobnego kwasu nukleinowego — **RNA (kwasu rybonukleinowego)** używając łańcucha DNA jako matrycy. Ten odcinek RNA o długości około 10 nukleotydów jest komplementarny do łańcucha DNA stanowiącego matrycę i służy polimerazie DNA jako miejsce startu. Odcinek ten służy więc jako *starter* (ang. primer) do syntezy DNA, a enzym, który go syntetyzuje, jest znany jako *prymaza*. Pod względem chemicznym łańcuch RNA jest podobny do łańcucha DNA, z tym, że zamiast deoksyrybozy zawiera rybozę, a zamiast tyminy (T) — uracyl (U), (patrz panel 2-6, s. 66–67).

Rys. 6-20. Synteza fragmentów DNA na nici opóźnionej. W komórkach eukariotycznych startery RNA powstają na nici opóźnionej co ok. 200 nukleotydów; każdy starter ma długość ok. 10 nukleotydów. W bakterii *E. coli* startery mają długośc ok. 5 nukleotydów, a fragmenty Okazaki ok. 1000 nukleotydów. Startery są usuwane przez nukleazy, które rozpoznają nici RNA w helisie RNA/DNA i wycinają je. Wycięcie nici RNA pozostawia lukę, którą następnie wypełnia naprawcza polimeraza DNA wyposażona w mechanizm korekcyjny. Kompletne fragmenty DNA łączy enzym zwany ligazą DNA, który katalizuje tworzenie się wiązania fosfodiestrowego między grupą 3'-OH jednego fragmentu a fosforanem na końcu 5' drugiego, co ostatecznie formuje ciągły rdzeń cukrowo-fosforanowy



Ponieważ jednak U może tworzyć parę z A, starter RNA jest syntetyzowany na matrycy DNA na zasadzie komplementarnego dopasowywania zasad dokładnie w ten sam sposób jak DNA.

W przypadku syntezy nici wiodącej DNA, starter RNA jest potrzebny tylko raz do rozpoczęcia replikacji w miejscu ori. Po utworzeniu się widełek replikacyjnych polimeraza DNA stale ma do swej dyspozycji sparowany koniec 3' rosnącego łańcucha DNA. Jednak w przypadku nici opóźnionej, której synteza przebiega w sposób nieciągły, stale potrzebne są nowe startery, co pokazuje rys. 6-17. W miarę jak ruch widełek replikacyjnych odsłania nowe odcinki jednoniciowego DNA, na nici opóźnionej co pewien czas powstają nowe startery. Do grupy 3'-hydroksylowej odcinka starterowego polimeraza DNA przyłącza deoksyrybonukleotyd i kontynuuje wydłużanie tego łańcucha, aż natrafi na poprzedni starter RNA (rys. 6-20).

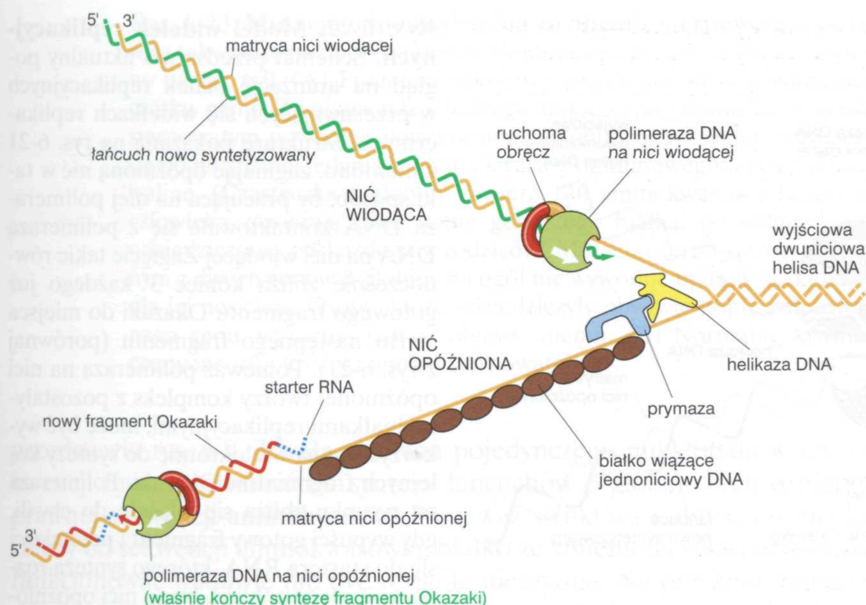
Aby z wielu oddzielnych odcinków DNA (zwanych *fragmentami Okazaki* od nazwiska biochemika, który je odkrył) syntetyzowanych na nici opóźnionej utworzyć kowalencyjnie ciągły łańcuch DNA, potrzebne są trzy dodatkowe enzymy. Enzymy te szybko usuwają starter RNA, zastępują go odcinkiem DNA i łączą kowalencyjnie kolejne fragmenty DNA. Startery DNA usuwa *nukleaza*, w miejsce usuniętego RNA *naprawcza polimeraza DNA* wprowadza deoksyrybonukleotydy, a enzym *ligaza DNA* łączy fosforan na końcu 5' jednego fragmentu DNA z 3'-hydroksylowym końcem fragmentu następnego (rys. 6-20). Enzymy te zostaną szerzej omówione w podrozdziale dotyczącym naprawy DNA.

Prymaza może inicjować syntezę łańcuchów polinukleotydowych, ale nie może sprawdzać wyników swojej pracy. W rezultacie startery zawierają stosunkowo dużo pomyłek. Ponieważ jednak starterami są odcinki RNA, a nie DNA, są one automatycznie usuwane jako „podejrzane" kopie i zastępowane przez DNA. Krótki odcinek DNA, zastępujący starter RNA, jest wstawiany przez naprawczą polimerazę DNA wyposażoną w mechanizm redagowania, podobnie jak polimerazy replikacyjne. W ten sposób komórkowy aparat replikacyjny może rozpoczynać syntezę nowych łańcuchów DNA i równocześnie zapewnić wierne powielenie całego DNA.

Pytanie 6-4. Przedyskutuj następujące twierdzenie: „Prymaza jest niedbałym enzymem, popełniającym wiele pomyłek. Startery RNA przez nią produkowane są usuwane i zastępowane DNA syntetyzowanym przez dokładnie działającą polimerazę DNA, ale jest to marnotrawstwem. Byłoby lepiej i energetycznie korzystniej, gdyby to od początku polimeraza DNA tworzyła dokładną komplementarną kopię matrycy.

Współpracujące ze sobą białka tworzą w widełkach replikacyjnych aparat replikacyjny

Z dotychczasowych rozważań wynika, że w replikacji DNA oprócz polimerazy DNA uczestniczy wiele innych białek. Obecnie zajmiemy się tymi dodatkowymi białkami, które razem z polimerazą DNA i prymazą tworzą maszynerię umożliwiającą przesuwanie się widełek replikacyjnych do przodu i syntezę DNA zachodzącą po ich drugiej stronie. (Sensowne byłoby zaliczyć do tej maszynerii te białka, które wymieniają startery RNA na



Rys. 6-21. Białka działające w widełkach replikacyjnych. Pokazano tu dwie cząsteczki polimerazy DNA, jedną na nici wiodącej, drugą na nici opóźnionej. Każdą wiąże z DNA ruchoma obręcz białkowa, umożliwiająca ślizgowe ruchy polimerazy wzdłuż DNA. Helikaza DNA rozplata wyjściową dwuniciową helisę i przesuwa się przed polimerazą DNA, wykorzystując do tego energię pochodzącą z hydrolizy ATP. Białka wiążące jednoniciowy DNA przeciwdziałają reasocjacji łańcuchów rozdzielonych przez helikazę i w ten sposób umożliwiają dostęp do nich prymazie i polimerazie DNA. Dla uproszczenia rysunek pokazuje każde z tych białek oddzielnie, w rzeczywistości w komórce tworzą one razem jeden aparat replikacyjny, którego zarys przedstawia rys. 6-22

odcinki DNA, tj. nukleazę, naprawczą polimerazę DNA i ligazę DNA, ale dotychczas nie wiadomo, czy istotnie białka te są jej składnikami.)

Na przedzie aparatu replikacyjnego działa *helikaza*. Jest to białko, które wykorzystując energię pochodzącą z hydrolizy ATP przesuwa się wzdłuż DNA i równocześnie rozplata jego helikalną strukturę (rys. 6-21). Poprzednio wskazaliśmy w tym rozdziale, że dwuniciowa helisa musi zostać „otwarta” zanim rozpocznie się replikacja. W miarę przesuwania się widełek replikacyjnych helisa musi być ciągle rozplatana, by udostępnić jednoniciową matrycę do replikacji i to zadanie spoczywa na helikazie. Inny składnik aparatu replikacyjnego — *białka wiążące jednoniciowy DNA* — łączą się z jednoniciowymi łańuchami poprzednio rozplecionymi przez helikazę i przejściowo przeciwdziałają ich ponownemu połączeniu. Jeszcze inne białko, określane jako *ruchoma obręcz*, decyduje o ścisłym wiązaniu matrycy DNA przez polimerazę DNA. Na nici opóźnionej ruchoma obręcz uwalnia DNA każdorazowo po skompletowaniu kolejnego fragmentu Okazaki. Białko to tworzy wokół DNA rodzaj pierścienia i wiąże polimerazę, umożliwiając jej ślizgowy ruch wzdłuż matrycy w miarę postępującej syntezy nowego łańcucha DNA (patrz rys. 6-21).

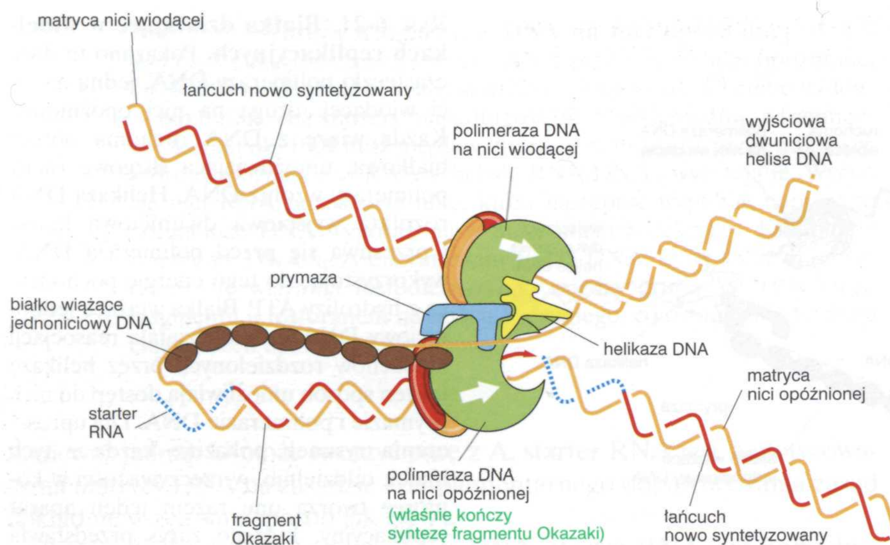
Przyjmuje się, że większość białek zaangażowanych w replikację DNA tworzy duży kompleks wieloenzymatyczny, przesuwający się w formie zwartej jednostki wzdłuż DNA, co umożliwia skoordynowaną syntezę obu łańcuchów potomnych. Kompleks ten można porównać z małą maszyną do szycia, zbudowaną z białkowych części i napędzaną przez hydrolizę trifosforanów. Chociaż szczegóły struktury aparatu replikacyjnego wymagają dalszych badań, jednak ogólny schemat jego budowy jest już znany (rys. 6-22).

Replikacja DNA wydaje się lepiej poznana niż wiele innych obszarów biologii komórki, nadal jednak pozostaje wiele zagadnień nie wyjaśnionych. Na przykład dotychczas nie wiadomo, w jaki sposób polimeraza działająca na nici wiodącej jest połączona z polimerazą na nici opóźnionej, co umożliwia synchroniczną syntezę obu tych nici. Co więcej, chociaż wiemy, w jaki sposób rozpoczyna się replikacja w miejscach początku replikacji w komórkach bakterii, wyjaśnianie tych procesów w komórkach człowieka znajduje się dopiero w początkowej fazie.

Znając wymogi dotyczące wierności replikacji oraz długość DNA zawartego w komórkach, nie jesteśmy zdziwieni, że komórki w toku

Pytanie 6-5. Gen kodujący jedno z białek uczestniczących w replikacji został w komórce zmutowany. Przy braku tego białka komórka próbuje po raz ostatni zreplikować swój DNA. Jakie produkty DNA powstałyby w przypadku braku:

A. Polimerazy DNA?
B. Ligazy DNA?
C. Ruchomej obręczy polimerazy DNA?
D. Nukleazy usuwającej startery RNA?
E. Helikazy DNA?
F. Prymazy?



Rys. 6-22. Model widełek replikacyjnych. Schemat przedstawia aktualny pogląd na aranżację białek replikacyjnych w przesuwających się widełkach replikacyjnych. Strukturę pokazaną na rys. 6-21 zmieniono, zaginając opóźnioną nić w taki sposób, by pracująca na niej polimeraza DNA kontaktowała się z polimerazą DNA na nici wiodącej Zagięcie takie równocześnie zbliża koniec 3' każdego już gotowego fragmentu Okazaki do miejsca startu następnego fragmentu (porównaj z rys. 6-21). Ponieważ polimeraza na nici opóźnionej tworzy kompleks z pozostałymi białkami replikacyjnymi, może być wykorzystywana wielokrotnie do syntezy kolejnych fragmentów Okazaki. Polimeraza na rysunku zbliża się właśnie do chwili, gdy wypuści gotowy fragment i przemieści się do startera RNA, którego synteza rozpocznie się w pobliżu, by na nici opóźnionej zainicjować tworzenie kolejnego fragmentu Okazaki

ewolucji wykształciły skomplikowany system białkowy, sprawdzający gotowy produkt i dokonujący korekty ewentualnych pomyłek popełnionych w trakcie replikacji (chociaż takie zdarzają się rzadko) oraz naprawiający przypadkowe uszkodzenia DNA, do których dochodzi pod wpływem światła, związków chemicznych docierających do komórki, lub innych czynników. Zagadnienia te omawia następny podrozdział.

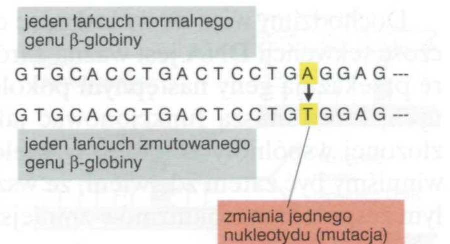
Naprawa DNA

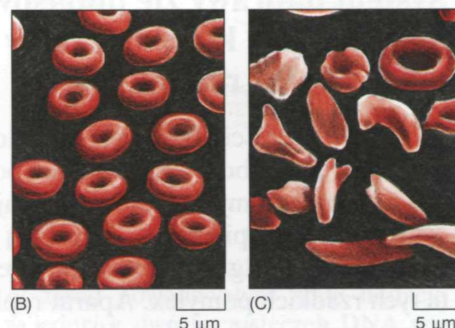
Różnorodność żywych organizmów i ich sukcesy w zasiedlaniu prawie każdego skrawka powierzchni Ziemi są wynikiem zmian genetycznych, które stopniowo akumulowały się w ciągu milionów lat, umożliwiając organizmom adaptację do zmieniających się warunków i zajmowanie nowych siedlisk. W krótkim czasie i z perspektywy indywidualnego organizmu zmiana genetyczna prawie zawsze jest szkodliwa, szczególnie w przypadku organizmów wielokomórkowych, u których zmiana genetyczna może z dużym prawdopodobieństwem wprowadzić zaburzenia w niezwykle złożonych i precyzyjnie regulowanych procesach rozwojowych i fizjologicznych. Aby przetrwać i być zdolne do rozrodu, indywidualne organizmy muszą być genetycznie stabilne. Stabilność taka wynika nie tylko z niezwykle dokładnego mechanizmu replikacji, ale także z funkcjonowania mechanizmów korygujących rzadko występujące pomyłki popełniane przez aparat replikacyjny oraz dokonujących naprawy przypadkowych uszkodzeń DNA, na które jest on stale narażony. Większość zmian w DNA ma charakter przejściowy, ponieważ są one natychmiast korygowane w procesach **naprawy DNA.**

Zmiany w DNA są przyczyną mutacji

Komórkowe mechanizmy replikacji i naprawy DNA czasem zawodzą, co powoduje wprowadzenie do DNA trwałych zmian. Trwała zmiana nazywa się **mutacją** i może mieć poważne konsekwencje. Mutacja zaledwie jednej pary zasad może doprowadzić do zniszczenia organizmu, jeśli występuje w ważnej pozycji w sekwencji DNA. Organizm człowieka do transportu tlenu wykorzystuje hemoglobinę; sekwencję nukleotydów kodujących jeden z dwóch typów łańcuchów białkowych (łańcuch β cząsteczki hemoglobiny)

Rys. 6-23. Mutacja odpowiedzialna za anemię sierpowatą. Całkowitą sekwencję nukleotydową genu kodującego β-globinę przedstawiono na rys. 6-9. (A) Fragment sekwencji znajdujący się w pobliżu początku genu. Zamiana tylko jednego nukleotydu (mutacja) w genie sierpowatym powoduje powstawanie β-globiny sierpowatej, różniącej się od normalnej jedynie zamianą kwasu glutaminowego w pozycji 6 na walinę. (Cząsteczka β-globiny zawiera 146 aminokwasów.) Komórki człowieka zawierają dwie kopie genu tego białka, po jednej kopii odziedziczonej od każdego z rodziców. Mutacja sierpowatości w jednym z dwóch genów β-globiny na ogół nie wywołuje ujemnych skutków dla jej nosiciela. Osoby, które odziedziczyły obydwie kopie zmutowanego genu, wykazują jednak objawy anemii. (B) Normalne krwinki czerwone; (C) krwinki anemii sierpowatej

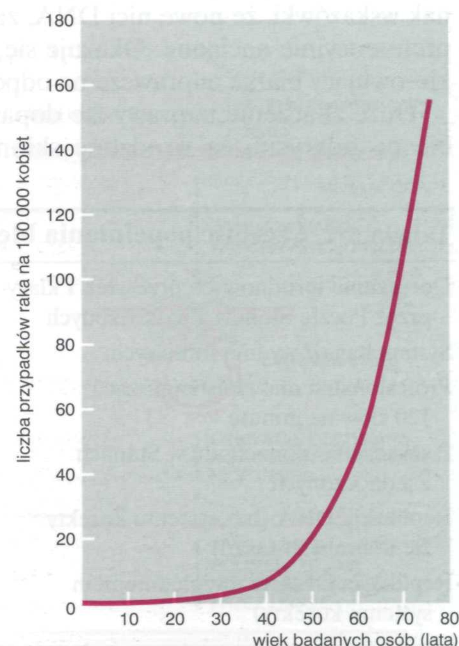




przedstawia rys. 6-9. Trwała zamiana pojedynczego nukleotydu w tej sekwencji może prowadzić do syntezy łańcuchów β-globinowych o niepoprawnej sekwencji aminokwasów. Ponieważ struktura i aktywność białka zależy od sekwencji aminokwasowej, białko ze zmienioną sekwencją może funkcjonować wadliwie lub być w ogóle nieczynne. Na przykład, mutacja odpowiedzialna za schorzenie znane jako *anemia sierpowata* wynika ze zmiany jednej pary nukleotydów w genie tego białka (rys. 6-23).

Hemoglobina sierpowata jest trudniej rozpuszczalna i tworzy włóknisty osad nadający charakterystyczny sierpowaty kształt krwinkom czerwonym osób dotkniętych tym schorzeniem. Komórki takie są delikatniejsze i często pękają w naczyniach krwionośnych, wskutek czego pacjenci z tym schorzeniem wykazują zmniejszoną liczbę czerwonych krwinek (rys. 6-23 C), co z kolei powoduje osłabienie, zawroty i bóle głowy i może zagrażać życiu.

Przykład anemii sierpowatej, będącej chorobą dziedziczną, ilustruje duże znaczenie ochrony komórek rozrodczych przed mutacjami. Mutacja w jednej z takich komórek będzie przekazana wszystkim komórkom organizmu, który z niej powstaje, łącznie z komórkami potrzebnymi do wytworzenia następnego pokolenia. Inne komórki w organizmie wielokomórkowym (komórki somatyczne) także muszą być chronione przed zmianami genetycznymi, żeby zapewnić jego zdrowie. Mutacje występujące w komórkach somatycznych mogą prowadzić do powstania zmienionych komórek, z których pewne rosną w niekontrolowany sposób kosztem innych komórek organizmu. W skrajnym przypadku niekontrolowane mnożenie się komórek powoduje raka. Zaburzenie to, odpowiedzialne za około trzydzieści procent zgonów w Europie i Ameryce Północnej, w dużym stopniu wynika z tego, że w komórkach somatycznych stopniowo akumulują się zmiany sekwencji DNA powodowane przez przypadkowe mutacje (rys. 6-24). Dziesięciokrotny wzrost częstości mutacji spowodowałby katastrofalny wzrost liczby przypadków raka przez zwiększenie szybkości powstawania zmienionych komórek somatycznych.



Rys. 6-24. Częstość występowania raka jako funkcja wieku. Liczba przypadków raka okrężnicy u kobiet w Anglii i Walii wykrytych w ciągu jednego roku jako funkcja wieku diagnozowanych osób. Ponieważ komórki stale ulegają przypadkowym zmianom DNA, a zmiany te kumulują się i są przekazywane komórkom potomnym, szansa przekształcenia się jakiejś komórki w komórkę nowotworową znacznie wzrasta z wiekiem organizmu. Widoczny szybki wzrost dotyczący starszych kobiet ujawnia, że częstość występowania raka wzrasta do szóstej potęgi wieku, co sugeruje, że rak pojawia się dopiero po wystąpieniu w komórce zespołu około sześciu mutacji w genach regulujących wzrost komórek okrężnicy. (Na podstawie danych: C. Muir et al., *Cancer Incidence in Five Continents*, Vol. V. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987)

Dochodzimy więc do wniosku, że duża wierność replikacji i zachowawczość sekwencji DNA jest ważna zarówno dla komórek rozrodczych, które przekazują geny następnym pokoleniom, jak i dla komórek somatycznych, które muszą funkcjonować jako dokładnie regulowane elementy złożonej wspólnoty komórek w wielokomórkowym organizmie. Nie powinniśmy być zatem zdziwieni, że wszystkie komórki dysponują doskonałym zespołem mechanizmów zmniejszającym liczbę mutacji w ich DNA.

System naprawy źle dopasowanych par zasad usuwa błędy, które uniknęły korekty przez aparat replikacyjny

W pierwszej części tego rozdziału widzieliśmy, że komórkowy aparat replikacyjny jest zabezpieczony przed popełnianiem pomyłek. Pomimo tych zabezpieczeń pomyłki jednak zdarzają się. Komórka dysponuje dlatego drugą linią zabezpieczenia, określaną jako *naprawa źle dopasowanych par zasad w DNA* (ang. DNA mismatch repair), którego zadaniem jest korekta tych rzadkich pomyłek. Aparat replikacyjny wprowadza w przybliżeniu jeden błędny nukleotyd na 10^7 nukleotydów poprawnych. System naprawy źle dopasowanych par zasad koryguje 99% tych błędów zwiększając ogólną dokładność do jednej pomyłki na 10^9 nukleotydów poprawnie dopasowanych. Ten poziom dokładności jest znacznie większy niż poziom, z którym się spotykamy w życiu codziennym (tab. 6-1).

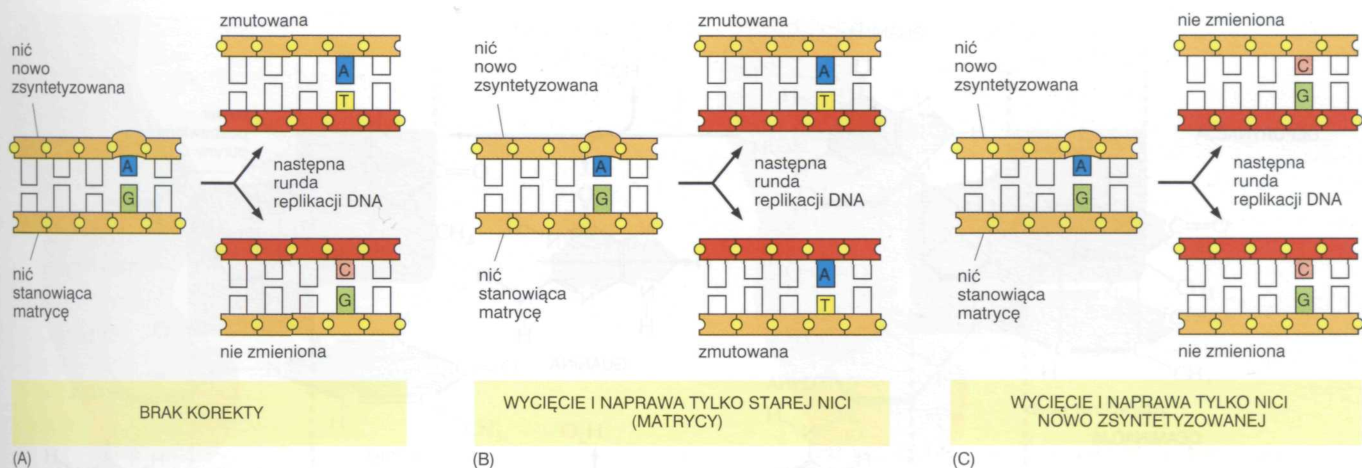
Gdy aparat replikacyjny popełni pomyłkę, każdorazowo powstaje miejsce, w którym nukleotydy nie tworzą właściwej pary zasad. Gdyby miejsca te pozostawić bez korekty, powodowałyby one wprowadzenie stałych mutacji w następnej rundzie replikacji DNA (rys. 6-25 A). Miejsca takie rozpoznaje kompleks białek naprawczych, który wycina fragment jednej z dwóch nici w obszarze błędnej pary i uzupełnia nowymi nukleotydami lukę powstałą po jego usunięciu (rys. 6-26). Aby skutecznie korygować pomyłki replikacyjne, system naprawczy musi wycinać zawsze tylko nić DNA nowo zsyntetyzowaną: wycięcie fragmentu z drugiej (starej) nici prowadziłoby do utrwalenia błędu, a nie do jego korekty (rys. 6-25).

Dotychczas nie wiemy dokładnie, w jaki sposób system naprawczy komórek eukariotycznych odróżnia stare nici DNA od nowych. Istnieją jednak wskazówki, że nowe nici DNA, zarówno wiodąca jak i opóźniona, są preferencyjnie nacinane. Okazuje się, że te nacięcia stanowią sygnał nakierowujący białka naprawcze na odpowiednią nić DNA (patrz rys. 6-26).

Duże znaczenie naprawy źle dopasowanych zasad uświadomiono sobie po odkryciu, że wrodzone skłonności do niektórych nowotworów

Tabela 6-1. Częstość popełniania błędów

Doręczanie terminowych przesyłek I klasy przez Pocztę Stanów Zjednoczonych	13 opóźnionych doręczeń na 100 przesyłek
System bagażowy linii lotniczych	1 zgubiony bagaż na 200
Profesjonalna maszynistka pisząca 120 słów na minutę	1 pomyłka na 250 liter
Prowadzenie samochodu w Stanach Zjednoczonych	1 śmiertelny wypadek w ciągu roku na 10^4 osób
Replikacja DNA (bez systemu korekty źle dobranych zasad)	1 pomyłka na 10^7 nukleotydów
Replikacja DNA (z uwzględnieniem systemu korekty)	1 pomyłka na 10^9 nukleotydów

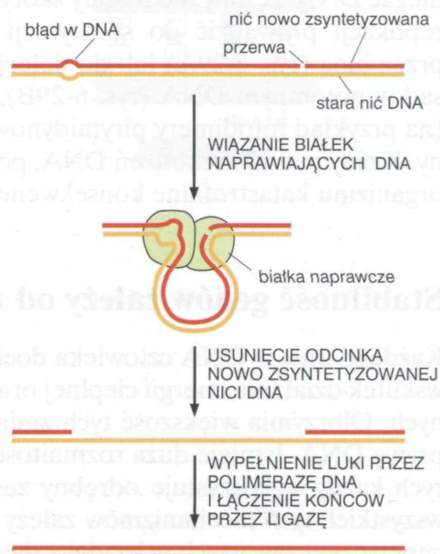


Rys. 6-25. Korekta błędnych par zasad w DNA. (A) Bez korekty błędne pary zasad powodowałyby stałe mutacje w jednej z dwóch cząsteczek DNA powstających w następnej rundzie replikacji. (B) Gdyby zły dobór pary był naprawiany z wykorzystaniem — jako matrycy — nici nowo zsyntetyzowanej, to w następnej rundzie replikacji mutacje byłyby zawarte w obydwóch potomnych cząsteczkach DNA. (C) Jeśli korekta źle dobranych nukleotydów następuje z wykorzystaniem starej nici jako matrycy, to możliwość mutacji zostaje wyeliminowana. Źle sparowane zasady komórka koryguje według schematu (C) w sposób pokazany na rys. 6-26

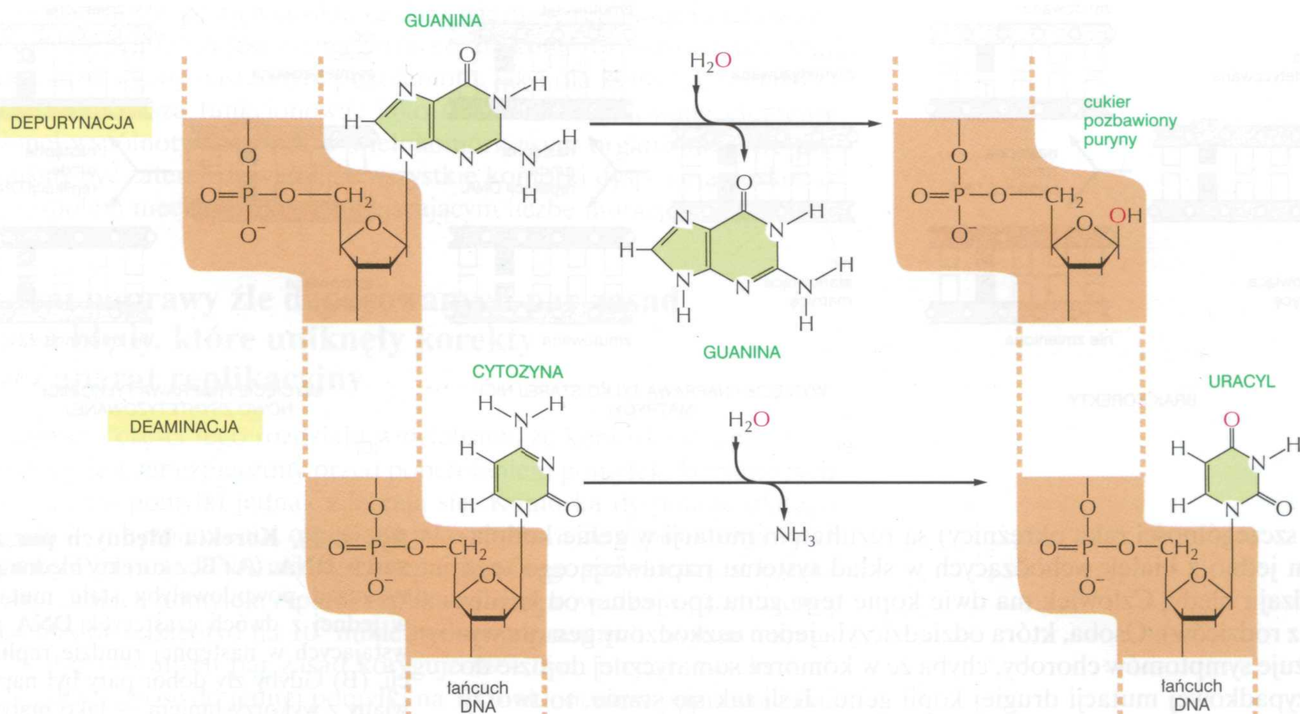
(w szczególności raka okrężnicy) są rezultatem mutacji w genie kodującym jedno z białek wchodzących w skład systemu naprawiającego tego rodzaju błędy. Człowiek ma dwie kopie tego genu (po jednej od każdego z rodziców). Osoba, która odziedziczyła jeden uszkodzony gen nie wykazuje symptomów choroby, chyba że w komórce somatycznej dojdzie do przypadkowej mutacji drugiej kopii genu. Jeśli tak się stanie, to tworzy się klon komórek somatycznych, w których błędy akumulują się szybciej niż w komórkach prawidłowych, gdyż w komórkach ze zmutowanymi obydwiema kopiami genu źle funkcjonuje system naprawy DNA. Większość nowotworów powstaje z komórek, w których doszło do zakumulowania różnych mutacji (patrz rys. 6-24). Z tego też powodu istnieje znaczne ryzyko transformacji nowotworowej komórek, w których wadliwie działa systemem naprawy par zasad. Dziedziczenie uszkodzonych genów naprawczych decyduje dlatego o osobniczej skłonności do raka.

Komórkowy DNA jest stale narażony na uszkodzenia

Jak widzieliśmy, rzadkie pomyłki powstające w trakcie replikacji — są zwykle korygowane dzięki mechanizmowi naprawy źle dobranych par zasad. DNA może jednak zostać uszkodzony w wiele różnych innych sposobów i uszkodzenia te wymagają innych mechanizmów naprawczych. Podobnie jak każda inna cząsteczka w komórce, DNA stale ulega zderzeniom termicznym z innymi cząsteczkami. Często prowadzi to do istotnych



Rys. 6-26. Mechanizm korekty źle sparowanych zasad w DNA komórek eukariotycznych. Źle dobrane zasady powodują zaburzenie geometrii dwuniciowej helisy DNA. Zaburzenia takie są rozpoznawane przez białka naprawiające DNA, które wycinają fragment nowo zsyntetyzowanej nici DNA. Utworzoną lukę w dwuniciowej strukturze uzupełnia następnie polimeraza DNA wyposażona w mechanizm korekty błędów, a proces naprawy kończy ligaza DNA, łącząca kowalencyjnie końce naprawionej nici. Jak pokazano na rysunku, sygnałem umożliwiającym białkom naprawczym odróżnienie nici nowo syntetyzowanej (w której znajduje się błędny nukleotyd) od nici starej jest przerwa w ciągłości nowego łańcucha. Przerwy takie występują na nici opóźnionej (patrz rys. 6-17) i zdarzają się, chociaż rzadziej, również na nici wiodącej. Przerwy utrzymują się tylko przez krótki czas po przejściu widełek replikacyjnych (patrz rys. 6-20), korekta musi więc nastąpić szybko



zmian chemicznych w DNA. Na przykład w czasie potrzebnym na przeczytanie tego zdania — w spontanicznej reakcji *depurynacji* (rys. 6-27) z DNA w naszych komórkach zostanie odłączone około biliona (10^{12}) zasad purynowych (A i G). Depurynacja nie zrywa wiązań fosfodiestrowych, powoduje jednak uszkodzenia przypominające ubytek zęba. Inną zmianą chemiczną jest spontaniczna utrata grupy aminowej (*deaminacja*) reszt cytozyny, prowadząca do powstania w ich miejscu reszt uracylu (patrz rys. 6-27). Czasami z zasadami w DNA reagują także niektóre reaktywne uboczne produkty metabolizmu, zmieniając sposób tworzenia się par zasad. Szkodliwe dla DNA jest też promieniowanie ultrafioletowe — powoduje ono tworzenie się kowalencyjnych wiązań między leżącymi obok siebie pirymidynami, co prowadzi, na przykład, do powstania dimerów tymidynowych pokazanych na rys. 6-28.

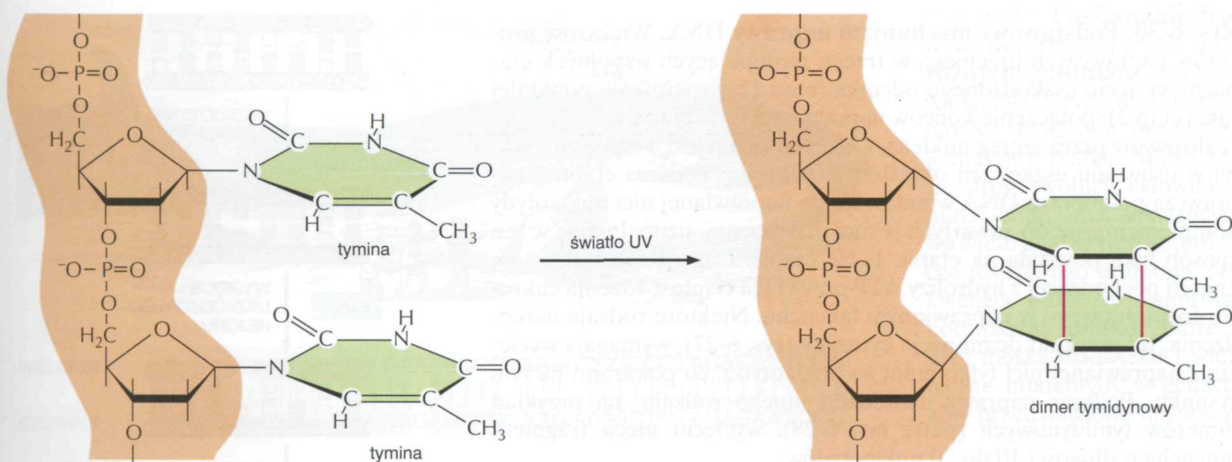
Przedstawiono tu tylko kilka z wielu zmian chemicznych, jakim może ulegać DNA. Jeśliby nie zostały skorygowane, zmiany te mogłyby podczas replikacji prowadzić do substytucji (podstawienia) jednej pary zasad przez inną (rys. 6-29A) lub do delecji (ubytku) jednej lub więcej par zasad w potomnym DNA (rys. 6-29B). Niektóre rodzaje uszkodzeń DNA (na przykład fotodimery pirymidynowe) często blokują aparat replikacyjny. Każdy rodzaj uszkodzeń DNA, pozostawiony bez naprawy, miałby dla organizmu katastrofalne konsekwencje.

Rys. 6-27. Depurynacja i deaminacja. Są to dwie najczęściej spotykane spontaniczne reakcje chemiczne powodujące poważne uszkodzenia DNA w komórkach. Depurynacja polega na oderwaniu guaniny (co przedstawia rysunek) lub adeniny od szkieletu . cukrowo-fosforanowego. Główny rodzaj reakcji deaminacji to przekształcenie cytozyny (pokazane na rysunku) w uracyl, który jest dla DNA nietypową zasadą. Deaminacji mogą ulegać także inne zasady. Reakcje te zachodzą na dwuniciowej helisie DNA; dla uproszczenia na tym rysunku pokazano tylko jeden łańcuch

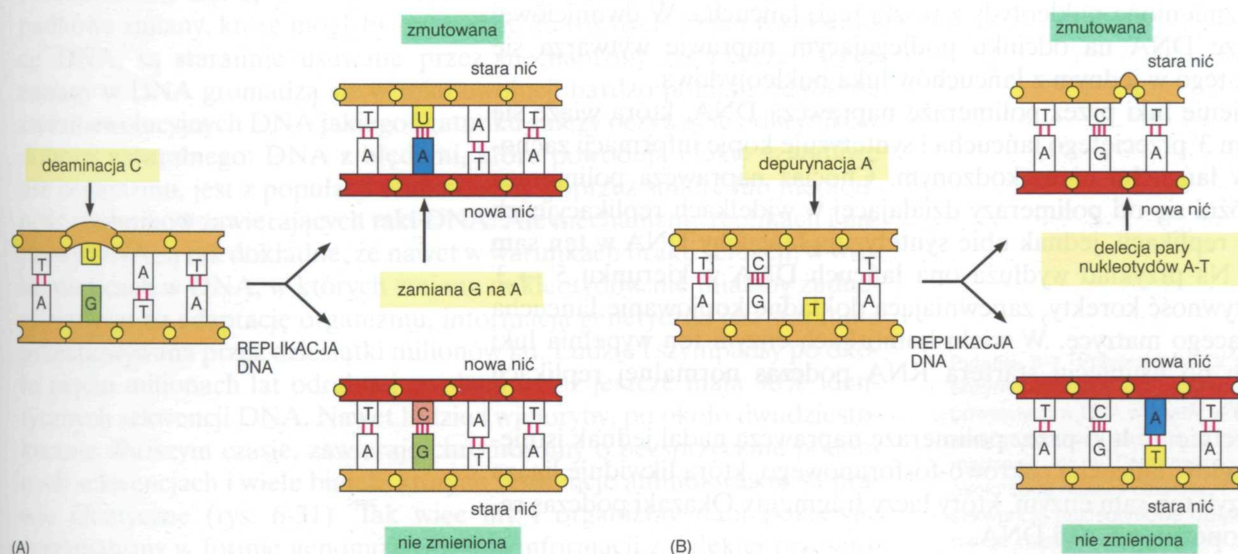
Pytanie 6-6. Przedyskutuj następujące twierdzenie:„Enzymy naprawcze DNA, które korygują uszkodzenia powstałe wskutek deaminacji i depurynacji, muszą preferencyjnie rozpoznawać takie uszkodzenia na nici nowo syntetyzowanej"

Stabilność genów zależy od naprawy DNA

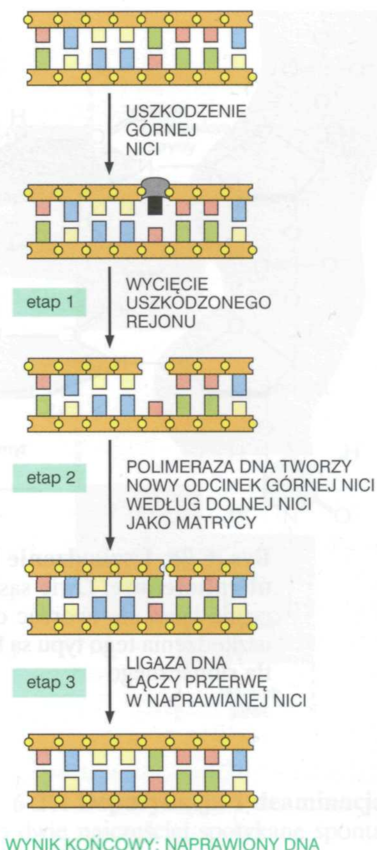
Każdego dnia w DNA człowieka dochodzi do tysięcy zmian chemicznych wskutek działania energii cieplnej oraz w wyniku przypadków metabolicznych. Olbrzymia większość tych zmian zostaje wyeliminowana przez naprawę DNA. Istnieje duża rozmaitość mechanizmów naprawczych, z których każdy wykorzystuje odrębny zestaw enzymów. Skuteczność prawie wszystkich tych mechanizmów zależy od istnienia dwóch kopii informacji genetycznej zawartych w każdej z dwóch nici helisy DNA: jeśli sekwencja



Rys. 6-28. Uszkodzenie DNA powodowane przez promieniowanie ultrafioletowe. Dwie sąsiadujące ze sobą zasady tyminowe kowalencyjnie łączą się tworząc dimer tymidynowy. Szczególnie narażone na uszkodzenia tego typu są komórki skóry, wystawione na działanie światła słonecznego



Rys. 6-29. Chemiczne modyfikacje nukleotydów wywołują mutacje. (A) Deaminacja cytozyny, jeśli nie zostanie naprawiona, powoduje substytucję jednej zasady podczas replikacji DNA. Jak pokazano na rys. 6-27, na skutek deaminacji cytozyny powstaje uracyl. Uracyl, w odróżnieniu od cytozyny, preferencyjnie tworzy parę z adeniną. Aparat replikacyjny, napotykając na nici matrycowej uracyl, wprowadza adeninę do nici nowo syntetyzowanej. (B) Depurynacja pozostawiona bez naprawy powoduje utratę pary nukleotydów. Jeśli aparat replikacyjny napotka na nici matrycowej cukier pozbawiony puryny, może takie miejsce pominąć i przejść do następnego nukleotydu, co prowadzi do delecji jednego nukleotydu w nici nowo syntetyzowanej



Rys. 6-30. Podstawowy mechanizm naprawy DNA. Większość procesów naprawczych przebiega w trzech następujących wspólnych etapach: wycięcie uszkodzonego odcinka (etap 1), wypełnienie powstałej luki (etap 2), połączenie końców naprawionej nici (etap 3). Etap 1 jest realizowany przez szereg nukleaz, z których każda jest wyspecjalizowana w usuwaniu uszkodzeń określonego rodzaju. Podczas etapu 2 naprawcza polimeraza DNA wbudowuje do naprawianej nici nukleotydy komplementarne do zawartych w nici matrycowej, uzupełniając w ten sposób lukę powstałą na etapie 1. Na etapie 3 ligaza DNA kosztem energii pochodzącej z hydrolizy ATP przywraca ciągłość rdzenia cukrowo-fosforanowego w naprawionym łańcuchu. Niektóre rodzaje uszkodzenia, na przykład deaminacja cytozyny (rys. 6-27), wymagają wycięcia z naprawianej nici tylko jednego nukleotydu, co pokazano na tym rysunku. Podczas naprawy uszkodzeń innego rodzaju, na przykład dimerów tymidynowych (patrz rys. 6-28), wycięciu ulega fragment łańcucha o długości 10 do 20 nukleotydów

nukleotydów jednej nici przypadkowo zostanie uszkodzona, to komórka nie traci informacji w sposób nieodwracalny, gdyż druga nić jest komplementarną wersją nici pierwszej (stanowi jej „zapasową dyskietkę"). W wyniku większości uszkodzeń tworzą się struktury, które nigdy nie występują w nieuszkodzonym DNA; tak więc łańcuch uszkodzony może być z łatwością odróżniony od nieuszkodzonego. Zasadniczy szlak naprawy DNA schematycznie przedstawiono na rys. 6-30. Obejmuje on trzy etapy:

1. Rozpoznanie i usunięcie uszkodzonego fragmentu łańcucha DNA przez jedną z różnych nukleaz, które zrywają wiązania kowalencyjne łączące zmienione nukleotydy z resztą tego łańcucha. W dwuniciowej strukturze DNA na odcinku podlegającym naprawie wytwarza się wskutek tego w jednym z łańcuchów luka nukleotydowa.
2. Wypełnienie luki przez polimerazę naprawczą DNA, która wiąże się z końcem 3' przeciętego łańcucha i syntetyzuje kopię informacji zachowanej w łańcuchu nieuszkodzonym. Chociaż naprawcza polimeraza DNA różni się od polimerazy działającej w widełkach replikacyjnych podczas replikacji, jednak obie syntetyzują łańcuchy DNA w ten sam sposób. Na przykład wydłuża ona łańcuch DNA w kierunku 5' → 3' i ma aktywność korekty, zapewniającą dokładne kopiowanie łańcucha stanowiącego matrycę. W wielu komórkach enzym ten wypełnia luki powstałe po usunięciu startera RNA podczas normalnej replikacji (patrz rys. 6-20).
3. Po uzupełnieniu luki przez polimerazę naprawczą nadal jednak istnieje nieciągłość łańcucha cukrowo-fosforanowego, którą likwiduje ligaza DNA, czyli ten sam enzym, który łączy fragmenty Okazaki podczas replikacji opóźnionej nici DNA.

Etapy 2 i 3 są prawie jednakowe dla różnych rodzajów naprawy DNA, z naprawą źle dopasowanych par zasad włącznie. Podczas pierwszego etapu czynnych jest jednak wiele różnych enzymów, z których każdy jest wyspecjalizowany w usuwaniu innego typu uszkodzeń DNA.

Na istotne znaczenie procesów naprawczych wskazują inwestycje, dokonywane przez komórki w odpowiednie enzymy. Organizmy jednokomórkowe, takie jak drożdże, zawierają ponad 50 różnych białek potrzebnych do naprawy DNA, a mechanizmy naprawy DNA u organizmów wyższych są jeszcze bardziej skomplikowane. Ważność mechanizmów naprawczych uwidaczniają też konsekwencje ich złego funkcjonowania. Na przykład u osób z genetycznym schorzeniem *xeroderma pigmentosum* nie zachodzi naprawa w miejscach tworzenia się dimerów pirymidynowych



```
WIELORYB   GTGTGGTCTCGTGATCAAAGGCGAAAGGTGGCTCTAGAGAATCCC
           ||||||||||| ||||| ||||| ||| |||||||||||||||||
CZŁOWIEK   GTGTGGTCTCGCGATCAGAGGCGCAAGATGGCTCTAGAGAATCCC
```

Rys. 6-31. Porównanie fragmentu genów determinujących płeć u dwóch różnych gatunków. Budowa ciała człowieka i wieloryba ogromnie się różni, jednak w skład obu organizmów wchodzą jednakowe białka. Mimo że od rozejścia się dróg ewolucji człowieka i wieloryba minął długi czas, sekwencja nukleotydowa wielu genów tych gatunków wciąż jeszcze jest bardzo podobna. Na dole — sekwencja nukleotydowa fragmentu genu kodującego białko, które determinuje płeć męską człowieka i wieloryba. Identyczne nukleotydy w genach obu gatunków przedstawiono na zielonym tle

(rys. 2-28) wskutek uszkodzenia genu kodującego jedno z białek naprawczych. U osób tych pojawiają się dotkliwe schorzenia skóry, z rakiem włącznie, ponieważ w komórkach eksponowanych na światło słoneczne dochodzi do akumulacji dimerów pirymidynowych i w konsekwencji do mutacji, a komórka nie dysponuje narzędziami ich usuwania.

Duża zachowawczość DNA oznacza, że podobne gatunki zawierają białka o podobnej sekwencji aminokwasów

Przekonaliśmy się, że DNA jest replikowany z dużą wiernością, a przypadkowe zmiany, które mogłyby prowadzić do trwałych zmian w sekwencji DNA, są starannie usuwane przez mechanizmy naprawcze. Toteż zmiany w DNA gromadzą się w toku ewolucji bardzo pomału. Szybkość zmian ewolucyjnych DNA jakiegoś gatunku zależy oczywiście od wyników doboru naturalnego: DNA z błędami, które powodują efekty szkodliwe dla organizmu, jest z populacji eliminowany poprzez śmierć lub niepłodność osobników zawierających taki DNA. Ale mechanizmy replikacji i naprawy DNA są tak dokładne, że nawet w warunkach braku selekcji, w wielu miejscach w DNA, w których zmiana nukleotydów nie miałaby żadnego wpływu na adaptację organizmu, informacja genetyczna jest starannie przechowywana przez dziesiątki milionów lat. Ludzie i szympansy po około pięciu milionach lat odrębnej ewolucji wciąż jeszcze mają 98% identycznych sekwencji DNA. Nawet ludzie i wieloryby, po około dwudziestokrotnie dłuższym czasie, zawierają chromosomy o bezsprzecznie podobnych sekwencjach i wiele białek, których sekwencje aminokwasów są prawie identyczne (rys. 6-31). Tak więc my i organizmy nam pokrewne otrzymaliśmy w formie genomów przekaz informacji z dalekiej przeszłości, i to dłuższy i bardziej szczegółowy niż zawarty w jakiejkolwiek książce. Dzięki wierności replikacji i dokładności procesów naprawczych setki milionów lat w niewielkim stopniu zmieniły jego istotną treść.

Pytanie 6-7. Przypuśćmy, że uległ mutacji enzym potrzebny do usuwania uszkodzeń powstałych w DNA wskutek utraty jakiejś zasady purynowej. Mutacja ta powoduje gromadzenie się w DNA naszego organizmu około 5000 mutacji dziennie. Przyjmując, że sekwencje nukleotydowe człowieka i szympansa różnią się przeciętnie o 1%, odpowiedz, jak długo trwałby proces przekształcenia się człowieka w małpę? Jaki błąd tkwi w tak postawionym pytaniu?

Streszczenie

- Życie zależy od trwałego i zwartego przechowywania informacji genetycznej.
- Nośnikiem informacji genetycznej są bardzo długie cząsteczki DNA, w których jest ona zakodowana w liniowej sekwencji nukleotydów A, T, G i C.
- Cząsteczka DNA tworzy dwuniciową helisę złożoną z dwóch komplementarnych łańcuchów nukleotydowych utrzymywanych razem za pomocą wiązań wodorowych łączących w pary A z T oraz G z C.
- Każdy łańcuch DNA wykazuje polarność chemiczną wynikającą ze sposobu wiązania się na przemian cukrów i fosforanów w łańcuchy cukrowo-fosforanowe. Łańcuchy w cząsteczce DNA są ułożone antyrównolegle, to znaczy przebiegają przeciwnie.
- Każdy z dwóch łańcuchów DNA może funkcjonować jako matryca do syntezy swego komplementarnego partnera. Dwuniciowa helisa DNA nosi zatem jednakowe informacje w każdym z łańcuchów.
- Cząsteczka DNA jest podwajana (replikowana) poprzez polimeryzację nowych łańcuchów na matrycy, którą jest każdy ze starych łańcuchów helisy. Proces replikacji DNA, w którym z wyjściowej cząsteczki tworzą się dwie identyczne cząsteczki potomne, umożliwia powielanie informacji genetycznej oraz jej przekazywanie z komórki wyjściowej komórkom potomnym oraz z rodziców na potomstwo.
- Podczas replikacji DNA dwie jego nici zostają oddzielone od siebie i tworzą widełki replikacyjne o kształcie litery Y. Polimeraza DNA, działająca w widełkach, tworzy nowe łańcuchy komplementarne do każdej z nici starych, a więc powstają dwie nowe dwuniciowe helisy.
- Polimeraza DNA odtwarza matrycę DNA z dużą wiernością, popełniając błąd rzadziej niż jeden raz na 10^7 nukleotydów wprowadzonych poprawnie. Jest to możliwe dlatego, że enzym koryguje własne pomyłki popełnione podczas polimeryzacji.
- Ponieważ polimeraza może syntetyzować nowe łańcuchy DNA tylko w jednym kierunku, w widełkach replikacyjnych tylko jeden łańcuch (nić wiodąca) może być replikowany w sposób ciągły. Na nici opóźnionej polimeraza DNA działa w sposób nieciągły, tworząc krótkie fragmenty DNA, które później są łączone przez ligazę DNA w jeden ciągły łańcuch.
- Zdolność polimerazy DNA do korygowania swoich błędów decyduje, że nie może ona rozpoczynać nowych łańcuchów DNA. Syntezę DNA rozpoczyna dlatego polimeraza RNA, nazywana prymazą, która syntetyzuje krótkie odcinki RNA, zwane starterami. Startery są następnie usuwane i zastępowane odcinkami DNA.
- Replikacja DNA wymaga współdziałania wielu białek, tworzących wieloenzymatyczny aparat replikacyjny umiejscowiony w widełkach replikacyjnych, który katalizuje syntezę DNA.
- Błędy powstające podczas replikacji DNA i w wyniku reakcji chemicznych prowadzą do zmian w sekwencji nukleotydowej DNA. Gdyby błędy te nie były sprawnie korygowane, powodowałyby powstanie mutacji, z których wiele byłoby dla organizmów szkodliwe. Informacja genetyczna może być trwale przechowywana w sekwencji DNA tylko dzięki temu, że różnorodne enzymy naprawcze sprawdzają DNA, korygują błędy replikacyjne i wymieniają uszkodzone nukleotydy. DNA może być łatwo naprawiany dzięki temu, że podczas naprawy jednego łańcucha drugi stanowi wzorzec poprawnej sekwencji.
- Rzadkie pomyłki popełniane przez aparat replikacyjny są korygowane przez białka, które naprawiają źle dobrane pary nukleotydów DNA: sprawdzają nowo zreplikowany DNA i usuwają pomyłki. Z uwzględnieniem tego systemu naprawczego ogólna wierność replikacji DNA wynosi jeden błąd na 10^9 poprawnych nukleotydów.
- Uszkodzenia DNA, powodowane przez reakcje chemiczne lub promieniowanie UV, są naprawiane przez rozmaite enzymy, które rozpoznają uszkodzony fragment DNA i wycinają krótki odcinek łańcucha zawierający uszkodzenie. Powstałą lukę uzupełnia następnie naprawcza polimeraza DNA, która wykorzystuje jako matrycę nieuszkodzony łańcuch DNA. Proces kończy ligaza, łącząca końce naprawionej nici DNA.

Hasła

antyrównoległy	komplementarny	nić opóźniona	RNA
DNA	korekta	nić wiodąca	replikacja DNA
dwuniciowa helisa	matryca	para zasad	widełki replikacyjne
gen	mutacja	początek replikacji	
genom	naprawa DNA	polimeraza DNA	

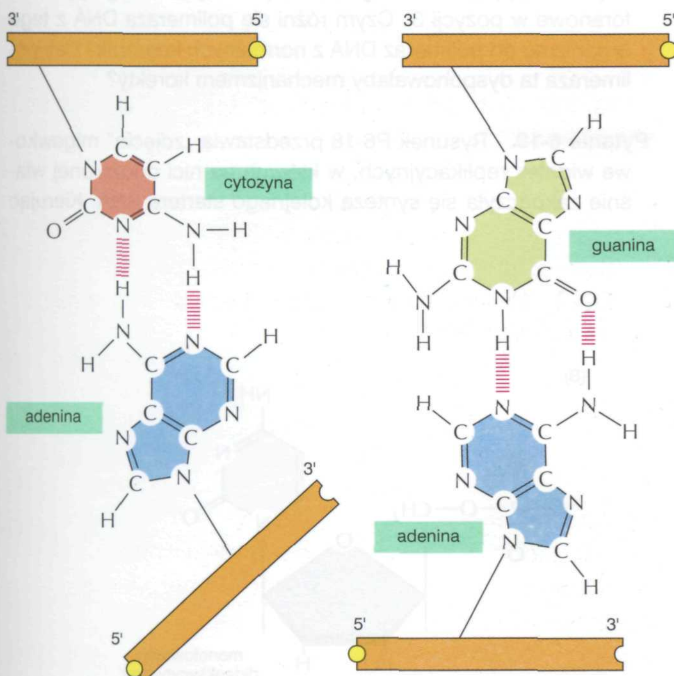
Pytania

Pytanie 6-8. Które z następujących twierdzeń są prawdziwe? Uzasadnij odpowiedzi.

A. Łańcuch DNA wykazuje polarność, ponieważ zasady zawierają hydrofilowe grupy aminowe.
B. Widełki replikacyjne są asymetryczne, ponieważ zawierają dwie cząsteczki polimerazy DNA różniące się strukturą.
C. Pary zasad G·C są bardziej stabilne niż pary A·T.
D. Fragmenty Okazaki są usuwane przez rybonukleazę.
E. Liczba błędów replikacji DNA ulega redukcji zarówno dzięki mechanizmowi korekty samej polimerazy DNA, jak i działaniu enzymów naprawczych DNA.
F. Jeśliby DNA nie był naprawiany, to geny byłyby niestabilne.
G. Nienormalne zasady powstające w reakcjach deaminacji nie występują w naturalnym DNA.
H. Skutkiem nie korygowanych mutacji są nowotwory komórek somatycznych.

Pytanie 6-9. Para zasad A·T jest stabilizowana tylko dwoma wiązaniami wodorowymi. Można sobie wyobrazić inne kombinacje zasad tworzących pary związane wiązaniami wodorowymi o podobnej sile, takie jak pary A·C lub A·G, pokazane na rys. P6-9. Co by się stało, gdyby takie pary powstawały podczas replikacji i gdyby nieodpowiednie nukleotydy były wprowadzane do łańcucha DNA? Uzasadnij, dlaczego tego rodzaju sytuacje rzadko się zdarzają? (Wskazówka: patrz rys. 6-5.)

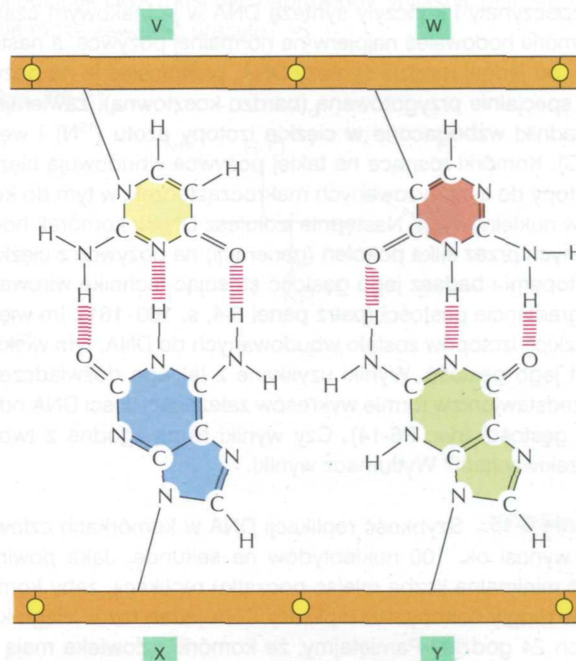
Rys. P6-9



Pytanie 6-10.

A. Makrocząsteczka wyizolowana ze źródła pochodzenia pozaziemskiego przypomina DNA, ale po dokładniejszym zbadaniu ujawnia zamiast A, T, G i C zasady o innej strukturze, pokazane na rys. P6-10. Dokładnie obejrzyj te struktury. Czy ta cząsteczka, podobna do DNA, mogła pochodzić z żywego organizmu, którego reguły genetycznego dziedziczenia są podobne do reguł wykorzystywanych przez organizmy ziemskie? Jeśli tak, to co można powiedzieć o cechach tego organizmu?
B. Czy którakolwiek z tych pozaziemskich zasad, sądząc na podstawie ich zdolności do tworzenia wiązań wodorowych, może zastąpić A, T, G lub C w ziemskim DNA? Uzasadnij odpowiedź.

Rys. P6-10



Pytanie 6-11. Dwa łańcuchy dwuniciowej helisy DNA mogą być oddzielone od siebie przez ogrzanie roztworu. W jakiej kolejności uległyby stopieniu, podczas ogrzewania roztworu, następujące trzy cząsteczki DNA? Uzasadnij odpowiedź.

A. 5'-GCGGGCCAGCCCGAGTGGGTAGCCCAGG-3'
3'-CGCCCGGTCGGGCTCACCCATCGGGTCC-5'
B. 5'-ATTATAAAATATTTAGATACTATATTTACAA-3'
3'-TAATATTTTATAAATCTATGATATAAATGTT-5'
C. 5'-AGAGCTAGATCGAT-3'
3'-TCTCGATCTAGCTA-5'

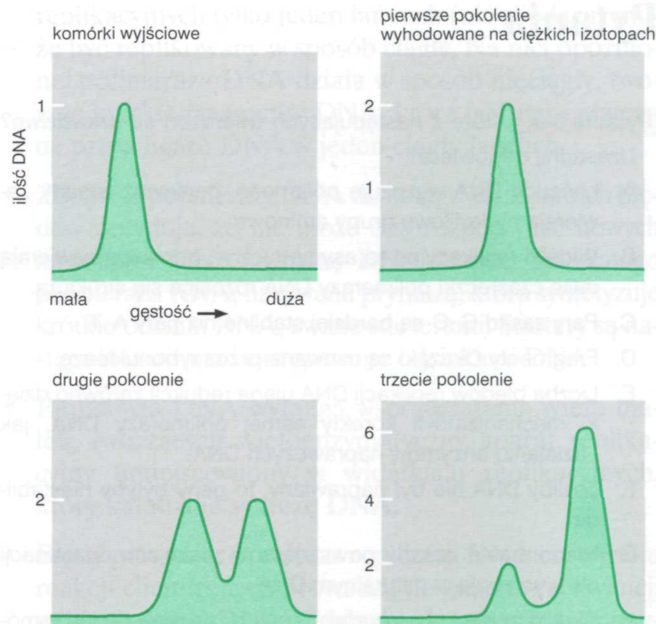
Pytanie 6-12. Całkowita długość DNA zawartego w komórce człowieka wynosi ok. 1 m. Dwuniciowa helisa DNA ma średnicę 2 nm. Odległość pomiędzy parami zasad w dwuniciowej helisie wynosi 0,34 nm. Gdyby DNA został tak powiększony, że jego średnica byłaby równa średnicy kabla elektrycznego (5 mm), to jak długi byłby całkowicie rozciągnięty „kabel” DNA? Jaka byłaby odległość pomiędzy parami zasad w takim modelu? Jaka byłaby długość genu złożonego z 1000 par zasad?

Pytanie 6-13. Dysk kompaktowy (CD) mieści ok. $4{,}8 \cdot 10^9$ bitów informacji na powierzchni 96 cm^2. Informacja jest zapisana w kodzie dwójkowym, to znaczy, że każdy bit jest albo 0, albo 1.

A. Ile bitów wymaga zapis jednej pary nukleotydów w sekwencji DNA?

B. Ile dysków kompaktowych zająłby zapis informacji zawartej w genomie człowieka?

Pytanie 6-14. Będąc urodzonym sceptykiem, planujesz potwierdzenie klasycznego doświadczenia przeprowadzonego w latach sześćdziesiątych przez Meselsona i Stahla, z którego wywnioskowali, że każda komórka potomna dziedziczy jeden i tylko jeden łańcuch DNA komórki macierzystej. Aby zrealizować swój plan, zsynchronizowałeś (metodę synchronizacji tutaj pominiemy) kulturę rosnących komórek, tak aby wszystkie rozpoczynały i kończyły syntezę DNA w jednakowym czasie. Komórki hodowałeś najpierw na normalnej pożywce, a następnie, po jednej rundzie syntezy DNA, przeniosłeś je na pożywkę specjalnie przygotowaną (bardzo kosztowną), zawierającą składniki wzbogacone w ciężkie izotopy azotu (^{15}N) i węgla (^{13}C). Komórki rosnące na takiej pożywce wbudowują ciężkie izotopy do syntetyzowanych makrocząsteczek, w tym do kwasów nukleinowych. Następnie izolujesz DNA z komórek hodowanych przez kilka pokoleń (generacji) na pożywce z ciężkimi izotopami i badasz jego gęstość stosując technikę wirowania w gradiencie gęstości (patrz panel 5-4, s. 160–161). Im więcej ciężkich izotopów zostało wbudowanych do DNA, tym większa jest jego gęstość. Wyniki uzyskane z takiego doświadczenia przedstawiono w formie wykresów zależności ilości DNA od jego gęstości (rys. P6-14). Czy wyniki te są zgodne z twoimi oczekiwaniami? Wytłumacz wyniki.



Rys. P6-14

Pytanie 6-15. Szybkość replikacji DNA w komórkach człowieka wynosi ok. 100 nukleotydów na sekundę. Jaka powinna być minimalna liczba miejsc początku replikacji, żeby komórki te mogły dokonywać replikacji DNA jeden raz w ciągu każdych 24 godzin? Pamiętajmy, że komórki człowieka mają po dwie kopie genomu, z których jedna pochodzi od matki, a druga od ojca i każda z nich zawiera $3 \cdot 10^9$ par zasad.

Pytanie 6-16. Obejrzyj dokładnie struktury związków pokazanych na rys. P6-16. Każdy z nich oddzielnie dodano do mieszaniny, w której zachodzi replikacja DNA.

A. Czego należałoby oczekiwać, gdyby związek A dodano do mieszaniny inkubacyjnej w dużym nadmiarze w stosunku do stężenia trifosforanu deoksycytydyny (dCTP)?

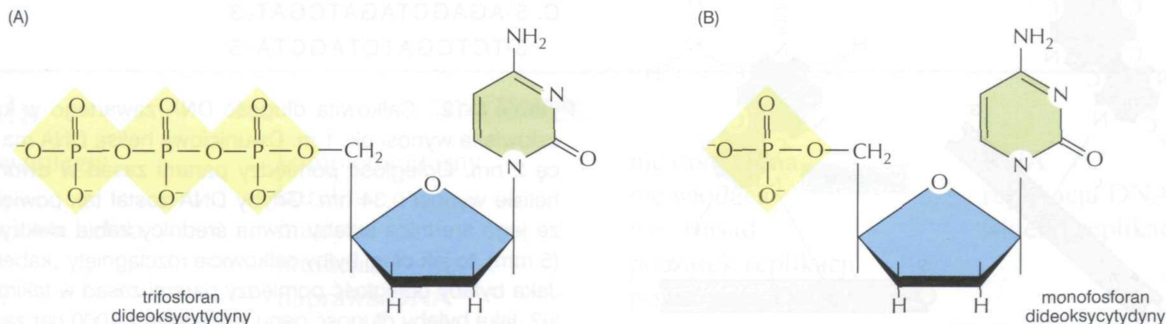
B. Jaki byłby skutek dodania związku A w ilości stanowiącej 10% ilości dCTP?

C. Jakich efektów należałoby się spodziewać, gdyby w tych samych warunkach w doświadczeniu użyto związku B?

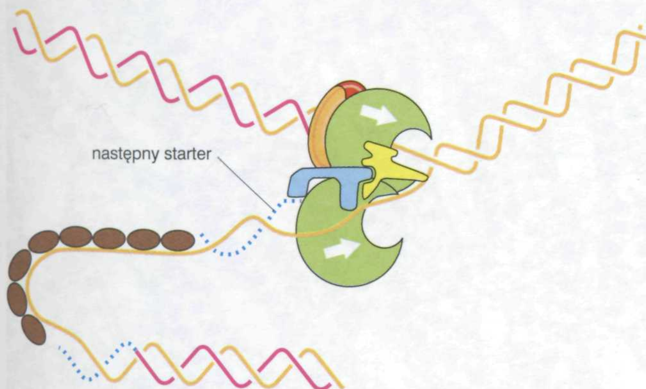
Pytanie 6-17. Materiał genetyczny jakiegoś hipotetycznego organizmu jest nieodróżnialny od DNA normalnych komórek. Przeprowadzone badania nieoczekiwanie jednak ujawniły, że ten DNA jest syntetyzowany z trifosforanów deoksyrybonukleozydów mających wolne grupy 5'-hydroksylowe, a grupy trifosforanowe w pozycji 3'. Czym różni się polimeraza DNA z tego organizmu od polimeraz DNA z normalnych komórek? Czy polimeraza ta dysponowałaby mechanizmem korekty?

Pytanie 6-18. Rysunek P6-18 przedstawia „zdjęcie" migawkowe widełek replikacyjnych, w których na nici opóźnionej właśnie zakończyła się synteza kolejnego startera RNA. Kierując

Rys. P6-16



się tym schematem naszkicuj położenie DNA podczas syntezy kolejnego fragmentu Okazaki. Dorysuj odpowiednią ruchomą obręcz oraz wskaż białka wiążące jednoniciowy DNA.



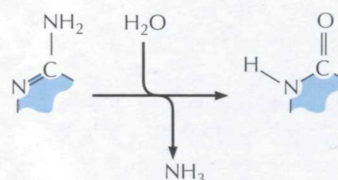
Rys. P6-18

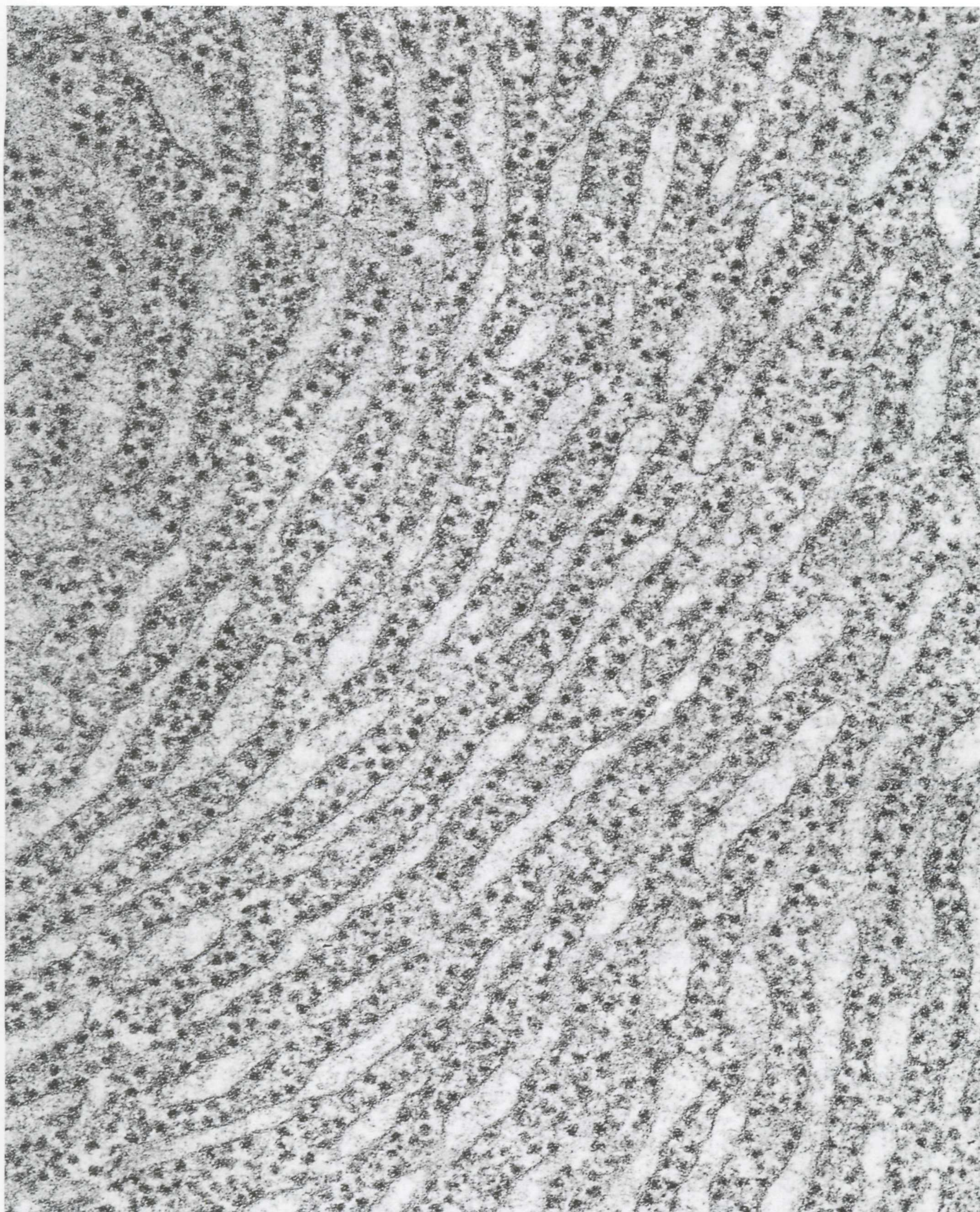
Pytanie 6-19. Ile (w przybliżeniu) wiązań „wysokoenergetycznych" zostaje zużytych podczas replikacji chromosomu bakteryjnego? Ile glukozy (w porównaniu do swojej masy wynoszącej około 10^{-12} g) bakteria musi zużyć, by uzyskać energię potrzebną do jednorazowego skopiowania swego DNA? Chromosom bakteryjny zawiera $3 \cdot 10^6$ par zasad. Utlenienie jednej cząsteczki glukozy dostarcza około 30 „wysokoenergetycznych" wiązań fosfobezwodnikowych. Masa cząsteczkowa glukozy wynosi 180. (Przypomnijmy, że jeden mol substancji zawiera $6 \cdot 10^{23}$ cząsteczek, patrz rozdz. 2).

Pytanie 6-20. Jaką, jeśli w ogóle, nieścisłość zawiera następujące twierdzenie: „Dla przetrwania gatunku istotna jest stabilność DNA zarówno w komórkach rozrodczych, jak i w komórkach somatycznych". Uzasadnij odpowiedź.

Pytanie 6-21. Częsty rodzaj uszkodzeń DNA jest wynikiem reakcji określanej jako „deaminacja", podczas której grupa aminowa ($—NH_2$) zasady zostaje zastąpiona atomem tlenu. Reakcję tę przedstawia rys. P6-21. Napisz wzory zasad A, G, C, T i U oraz zaproponuj produkty, jakie mogłyby z nich powstać w wyniku reakcji deaminacji. Pamiętając, że w komórce produkty tej reakcji muszą być rozpoznane i następnie odpowiedni odcinek DNA musi być naprawiony, wyjaśnij, dlaczego DNA nie może zawierać uracylu?

Rys. P6-21





W procesie określanym jako translacja rybosomy — stanowiące wieloskładnikowe „maszyny" do wytwarzania białek — przekładają informację zawartą w RNA na sekwencję aminokwasów w syntetyzowanych białkach. Na przedstawionej tu mikrografii elektronowej fragmentu eukariotycznej komórki widać tysiące rybosomów zasocjowanych z błonami retikulum endoplazmatycznego; rybosomy te uczestniczą w syntezie białek przeznaczonych do wydzielenia poza komórkę. (Dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)

7
Od DNA do białka

OD DNA DO RNA

- Część sekwencji DNA ulega transkrypcji do RNA
- Podczas transkrypcji powstaje RNA komplementarny do jednej nici DNA
- Komórki wytwarzają kilka rodzajów RNA
- Sygnały na DNA informują polimerazę RNA, od którego miejsca rozpocząć transkrypcję i gdzie ją zakończyć
- Eukariotyczne RNA podlegają w jądrze komórkowym procesom dojrzewania
- Eukariotyczne geny są poprzerywane sekwencjami niekodującymi
- Introny są usuwane z RNA w procesie splicingu
- Komórki degradują cząsteczki własnego mRNA
- Geny prakomórek prawdopodobnie zawierały introny

OD RNA DO BIAŁKA

- Informacja w mRNA jest zakodowana w postaci zestawów trójek nukleotydów
- Cząsteczki tRNA dopasowują aminokwasy do kodonów mRNA
- Swoiste enzymy łączą tRNA z odpowiednimi aminokwasami
- Odczytywanie informacji zawartej w mRNA odbywa się na rybosomach
- Kodony mRNA sygnalizują, gdzie zacząć i gdzie skończyć syntezę białka
- Białka powstają na polirybosomach
- Kontrolowany rozkład białek umożliwia komórkom regulację poziomu każdego białka
- Droga od DNA do białek obejmuje wiele etapów

RNA A POCZĄTKI ŻYCIA

- W warunkach prebiotycznych mogły powstawać proste cząsteczki biologiczne
- RNA może zarówno przechowywać informacje, jak i katalizować reakcje chemiczne
- RNA jest ewolucyjnie starszy niż DNA

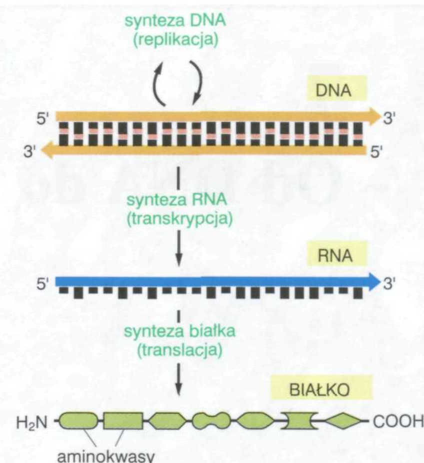
Po odkryciu we wczesnych latach pięćdziesiątych struktury DNA (kwasu deoksyrybonukleinowego), stało się jasne, że informacja genetyczna jest zakodowana w sekwencji nukleotydów DNA. W rozdziale 6 zobaczyliśmy, jak informacja ta w procesie replikacji jest wiernie przekazywana z komórek macierzystych do potomnych. Jak jednak komórka dekoduje i wykorzystuje tę informację? W jaki sposób instrukcje genetyczne, zapisane alfabetem złożonym z czterech „liter" — czterech różnych nukleotydów w DNA — kierują formowaniem się bakterii, muszki owocowej lub człowieka? Wprawdzie wciąż jeszcze pozostaje wiele problemów wymagających wyjaśnienia (nie wiemy na przykład, w jaki sposób informacja zawarta w genach organizmu prowadzi do chociażby najprostszej jednokomórkowej bakterii, nie mówiąc o złożonych, wielokomórkowych organizmach, takich jak ssaki), ale kod DNA został rozszyfrowany i język genów stał się zrozumiały.

O tym, że informacja genetyczna w jakiś sposób kieruje syntezą białek, wiedziano jeszcze przed rozszyfrowaniem kodu genetycznego. Białka są podstawowymi składnikami komórek i determinują nie tylko ich strukturę, ale także funkcje. W poprzednich rozdziałach spotkaliśmy się z niektórymi spośród tysięcy różnych rodzajów białek, które mogą być wytwarzane przez komórki. W rozdziale 5 przekonaliśmy się, że właściwości i funkcje białek są determinowane przez liniową kolejność — *sekwencję* reszt aminokwasów w ich łańcuchach polipeptydowych. Każde białko ma unikatową dla siebie sekwencję aminokwasów i sekwencja ta dyktuje sposób fałdowania się łańcucha nadający cząsteczce typowy dla niej kształt i cechy chemiczne. Instrukcje genetyczne zawarte w DNA muszą więc decydować o sekwencji aminokwasów w białkach. W tym rozdziale zobaczymy, jak to właściwie się odbywa.

DNA nie kieruje syntezą białka „osobiście", działa raczej jak menedżer, dający różne polecenia zespołom swoich pracowników. Kiedy w komórce jest potrzebne określone białko, to najpierw odpowiednia sekwencja niezmiernie długiej chromosomowej cząsteczki DNA ulega przepisaniu na *kwas rybonukleinowy, RNA*. Bezpośrednią matrycą do syntezy białka są właśnie cząsteczki RNA, stanowiące kopie stosunkowo krótkich segmentów DNA. W ciągu sekundy w każdej komórce naszego ciała zachodzą tysiące jednostkowych procesów przepisywania informacji z DNA na RNA.

Informacja genetyczna przepływa więc od DNA do RNA, a następnie do białek (rys. 7-1). Wszystkie komórki, od bakterii do człowieka, wyrażają swoją informację genetyczną w ten właśnie sposób — jest to reguła tak fundamentalna, że nazwano ją *centralnym dogmatem* biologii molekularnej.

Celem tego rozdziału jest wyjaśnienie mechanizmów stosowanych przez komórki do przepisywania informacji z DNA na RNA (proces ten nazywa się *transkrypcją*) i następnie wykorzystania informacji zawartych w RNA do wytworzenia białka, czyli do *translacji*. W końcowych częściach tego rozdziału omówimy, w jaki sposób obecny system przechowywania informacji, transkrypcji i translacji mógł powstać z prostszych systemów, czynnych we wcześniejszych stadiach ewolucji.



Rys. 7-1. Od DNA do białka. We wszystkich żyjących komórkach informacja genetyczna przepływa od DNA do RNA (transkrypcja) i od RNA do białek (translacja)

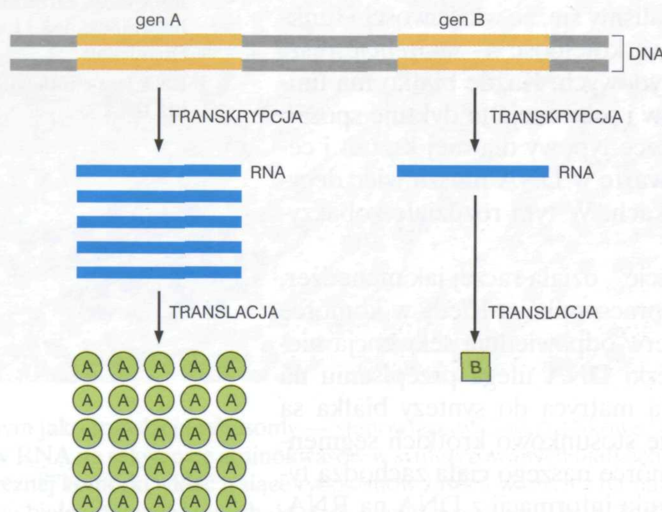
Od DNA do RNA

Komórki odczytują i wykonują instrukcje genetyczne poprzez procesy transkrypcji i translacji, czyli przez ekspresję zawartych w nich *genów*. Z jednego genu może powstać wiele identycznych cząsteczek RNA, a każda cząsteczka RNA może kierować syntezą wielu identycznych cząsteczek białka. Ponieważ w komórce znajduje się zwykle pojedyncza kopia jakiegoś genu, takie wielokrotnie powtarzane procesy transkrypcji umożliwiają jej wyprodukowanie potrzebnej ilości białek znacznie szybciej, niż gdyby DNA sam był bezpośrednią matrycą do ich syntezy. Każdy z genów może ulegać transkrypcji i translacji z inną wydajnością, co dla komórek stanowi sposób na wytwarzanie dużej ilości jednych białek, a znikomej innych (rys. 7-2). Co więcej, jak zobaczymy w rozdz. 8, komórki mogą zmieniać (czyli regulować) ekspresję każdego ze swoich genów stosownie do aktualnych potrzeb. Omawianie ekspresji genów rozpoczniemy od wytwarzania RNA, stanowiącego jej pierwszy etap.

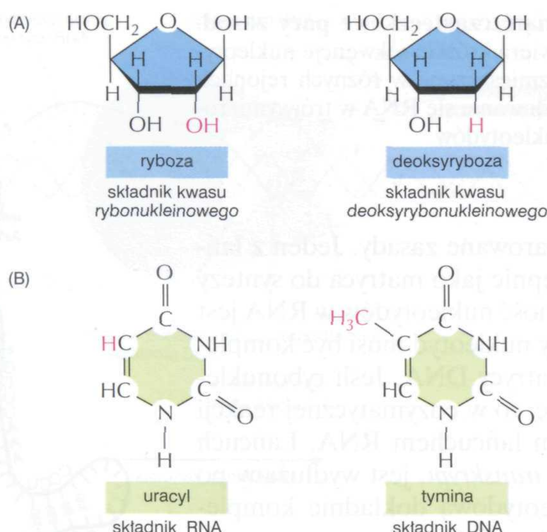
Pytanie 7-1. Rozważ termin „centralny dogmat" odnoszący się do koncepcji, że informacja genetyczna przepływa od DNA przez RNA do białka. Czy słowo „dogmat" jest poprawne w naukowym kontekście tej informacji?

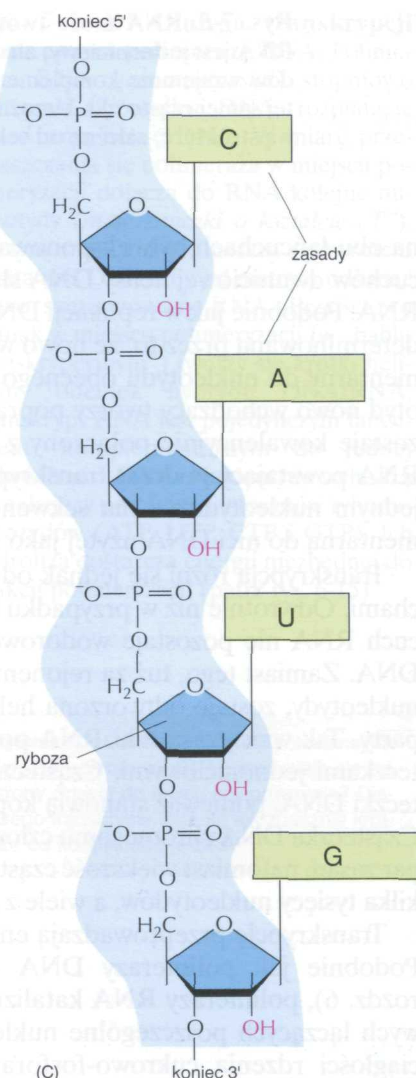
Część sekwencji DNA ulega transkrypcji do RNA

Pierwszy krok, jaki komórki podejmują, by odczytać instrukcje genetyczne, polega na przepisaniu określonej części sekwencji nukleotydów DNA, czyli genu, na sekwencje nukleotydowe RNA. Proces ten nazwano **transkrypcją** (przepisywaniem), mimo że RNA chemicznie różni się od DNA. W obydwu rodzajach kwasów nukleinowych informacja jest zapisana w tym samym języku, to jest w sekwencji czterech rodzajów nukleotydów.



Rys. 7-2. Wydajność ekspresji genów może być różna. Gen A ulega transkrypcji i translacji znacznie wydajniej niż gen B. Umożliwia to komórce uzyskanie dużo większej ilości białka A niż białka B





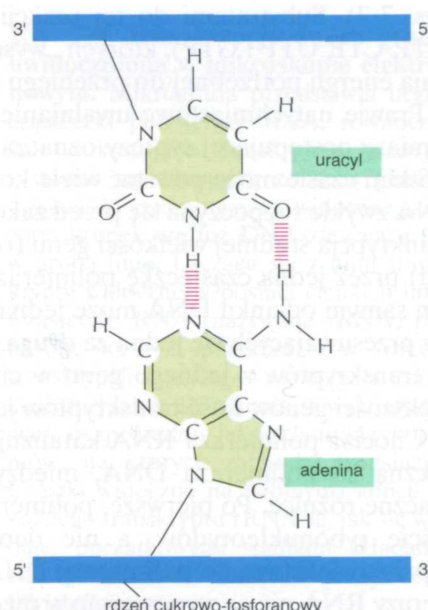
Rys. 7-3. Chemiczna struktura RNA. (A) RNA zawiera rybozę, cukier różniący się od deoksyrybozy, wchodzącej w skład DNA, obecnością dodatkowej grupy —OH. (B) W skład RNA wchodzi uracyl, natomiast w skład DNA tymina. Uracyl różni się od od tyminy jedynie brakiem grupy —CH_3. (C) Krótki odcinek łańcucha RNA. Wiązania chemiczne między nukleotydami w RNA są takie same jak w DNA

Podobnie jak DNA, RNA jest liniowym polimerem zbudowanym z czterech rodzajów nukleotydów, połączonych wiązaniami fosfodiestrowymi (rys. 7-3). RNA różni się jednak od DNA pod dwoma względami: 1) w skład RNA wchodzą rybonukleotydy, zawierające cukier rybozę (stąd też nazwa kwas *rybonukleinowy*), a nie deoksyrybozę; 2) RNA zawiera, podobnie jak DNA, zasady: adeninę (A), guaninę (G) i cytozynę (C), jednak zamiast tyminy (T) zawiera uracyl (U). Ponieważ U, podobnie jak T, może tworzyć parę zasad z A (rys. 7-4), reguły komplementarności opisane w rozdz. 6 dla DNA obowiązują także RNA.

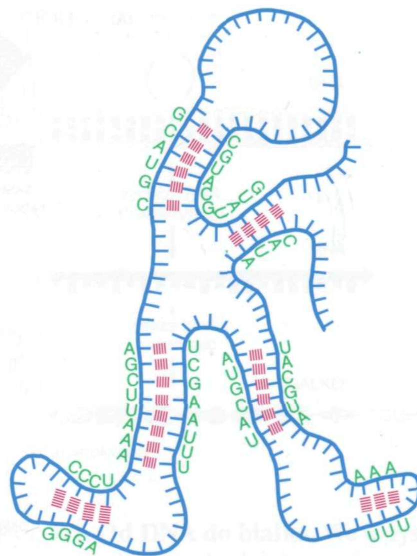
Pomimo niewielkich tylko różnic chemicznych, DNA i RNA znacznie różnią się pod względem ogólnej budowy. DNA występuje w komórkach zawsze w postaci dwuniciowej helisy, natomiast RNA jest jednoniciowy. Co więcej, łańcuch RNA może pofałdować się i utworzyć cząsteczki o rozmaitych kształtach, podobnie jak łańcuch polipeptydowy fałdując się tworzy ostateczny kształt cząsteczki białka (rys. 7-5). Jak zobaczymy w dalszym ciągu tego rozdziału, zdolność RNA do przybierania złożonej struktury przestrzennej umożliwia mu pełnienie w komórce dodatkowo innych funkcji niż tylko pośredniczenie w przekazywaniu informacji pomiędzy DNA i białkami. Podczas gdy DNA działa wyłącznie jako magazyn informacji, RNA, którego różne rodzaje istnieją w komórkach, pełni czasami funkcje strukturalne, a nawet katalityczne.

Podczas transkrypcji powstaje RNA komplementarny do jednej nici DNA

Cały RNA zawarty w komórce powstaje podczas transkrypcji, procesu wykazujacego pewne podobieństwa do replikacji DNA (rozdz. 6). Rozpoczyna się to od rozplecenia krótkiego odcinka dwuniciowej helisy DNA, tak by



Rys. 7-4. Uracyl tworzy parę zasad z adeniną. Uracyl ma taką samą zdolność tworzenia par jak tymina. Para U·A jest dlatego bardzo podobna do pary T·A (patrz rys. 6-5)



Rys. 7-5. RNA może tworzyć wewnątrzcząsteczkowe pary zasad. RNA jest jednoniciowy, ale często zawiera krótkie sekwencje nukleotydów wzajemnie komplementarne, rozmieszczone w różnych rejonach tej samej cząsteczki. Umożliwia to fałdowanie się RNA w trójwymiarową strukturę, zależną od sekwencji nukleotydów

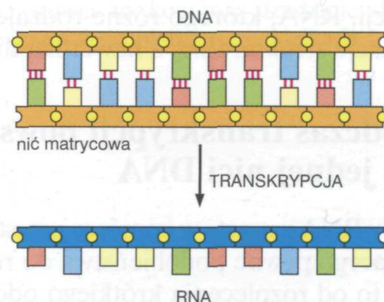
na obu łańcuchach były eksponowane niesparowane zasady. Jeden z łańcuchów dwuniciowej helisy DNA służy następnie jako matryca do syntezy RNA. Podobnie jak w replikacji DNA, kolejność nukleotydów w RNA jest determinowana przez to, że nowo wchodzący nukleotyd musi być komplementarny do nukleotydu obecnego już w matrycy DNA. Jeśli rybonukleotyd nowo wchodzący tworzy poprawną parę, to w enzymatycznej reakcji zostaje kowalencyjnie połączony z rosnącym łańcuchem RNA. Łańcuch RNA powstający podczas transkrypcji, czyli *transkrypt*, jest wydłużany po jednym nukleotydzie i ma sekwencję nukleotydową dokładnie komplementarną do nici DNA użytej jako matryca (rys. 7-6).

Transkrypcja różni się jednak od replikacji DNA kilkoma istotnymi cechami. Odwrotnie niż w przypadku nowo powstałego łańcucha DNA, łańcuch RNA nie pozostaje wodorowo związany z matrycowym łańcuchem DNA. Zamiast tego, tuż za rejonem, w którym są dołączane kolejne rybonukleotydy, zostaje odtworzona helisa DNA, a łańcuch RNA zostaje wyparty. Tak więc cząsteczki RNA powstające podczas transkrypcji są cząsteczkami jednoniciowymi. Cząsteczki RNA są znacznie krótsze niż cząsteczki DNA, ponieważ stanowią kopie tylko ograniczonych rejonów DNA. Cząsteczka DNA chromosomu człowieka może mieć długość 250 milionów par zasad, natomiast większość cząsteczek RNA ma długość nie większą niż kilka tysięcy nukleotydów, a wiele z nich jest znacznie krótszych.

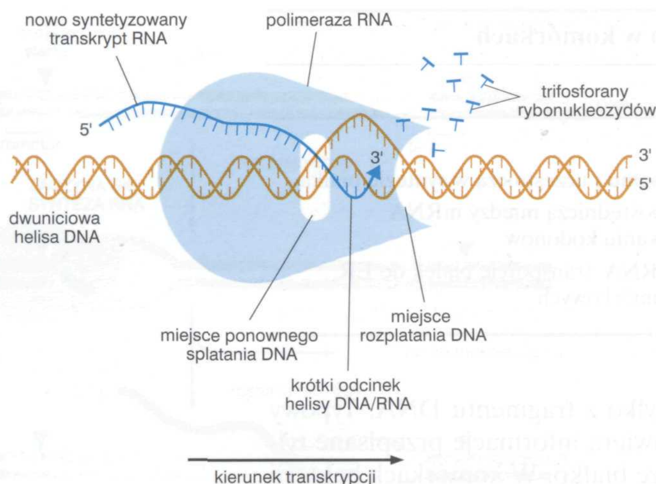
Transkrypcję przeprowadzają enzymy nazywane **polimerazami RNA**. Podobnie jak polimerazy DNA katalizujące replikację DNA (patrz rozdz. 6), polimerazy RNA katalizują tworzenie się wiązań fosfodiestrowych łączących poszczególne nukleotydy i decydujących o kowalencyjnej ciągłości rdzenia cukrowo-fosforanowego łańcucha RNA. Polimeraza RNA przesuwając się krok po kroku wzdłuż DNA rozplata przed sobą jego dwuniciową helisę, by udostępnić nowy odcinek nici matrycowej do tworzenia komplementarnych par zasad. W ten sposób rosnący łańcuch RNA jest każdorazowo wydłużany o jeden nukleotyd w kierunku 5'→ 3'. (rys. 7-7). Substratami do tej reakcji są trifosforany rybonukleozydów (ATP, CTP, UTP i GTP), których „wysokoenergetyczne" wiązania dostarczają energii potrzebnej do przebiegu reakcji (patrz rys. 6-15).

Prawie natychmiastowe uwalnianie łańcucha RNA od matrycy DNA w miarę postępującej syntezy oznacza, że z jednego genu w stosunkowo krótkim czasie może powstać wiele kopii RNA, gdyż synteza następnego RNA zwykle rozpoczyna się przed zakończeniem poprzedniego (rys. 7-8). Trankrypcja średniej wielkości genu (o wielkości powiedzmy 1500 par zasad) przez jedną cząsteczkę polimerazy RNA trwa około 50 sekund. Na tym samym odcinku DNA może jednak równolegle pracować 15 polimeraz przesuwających się jedna za drugą, co umożliwia syntezę ponad tysiąca transkryptów z jednego genu w ciągu jednej godziny. W przypadku większości genów ilość transkryptów jest jednak znacznie mniejsza.

Chociaż polimeraza RNA katalizuje w zasadzie tę samą reakcję chemiczną co polimeraza DNA, między tymi dwoma enzymami istnieją znaczne różnice. Po pierwsze, polimeraza RNA katalizuje łączenie oczywiście rybonukleotydów, a nie deoksyrybonukleotydów. Po drugie, w przeciwieństwie do polimerazy DNA czynnej podczas replikacji, polimerazy RNA nie są wyposażone w mechanizm sprawdzający i korygujący



Rys. 7-6. Podczas transkrypcji powstaje łańcuch RNA komplementarny do jednej z nici DNA



Rys. 7-7. DNA ulega transkrypcji przez enzym polimerazę RNA. Polimeraza RNA (*jasnoniebieska*) stopniowo przesuwa się wzdłuż DNA, rozplatając przed sobą helisę DNA. W miarę przemieszczania się polimeraza w miejscu polimeryzacji dołącza do RNA kolejne nukleotydy (*małe znaczki o kształcie „T"*). Za tym miejscem polimeraza z powrotem splata nici DNA, aby od matrycy odsunąć nowo syntetyzowany RNA. Przejściowo jednak w miejscu polimeryzacji (w „bąblu transkrypcyjnym") tworzy się krótki helikalny odcinek hybrydu DNA/RNA. Transkrypt RNA jest pojedynczym łańcuchem, komplementarnym do jednej z dwóch nici DNA. Nukleotydy wchodzą w reakcję w postaci trifosforanów rybonukleozydów (ATP, UTP, CTP i GTP). Ich hydroliza dostarcza energii niezbędnej do reakcji polimeryzacji (patrz rys. 6-15)

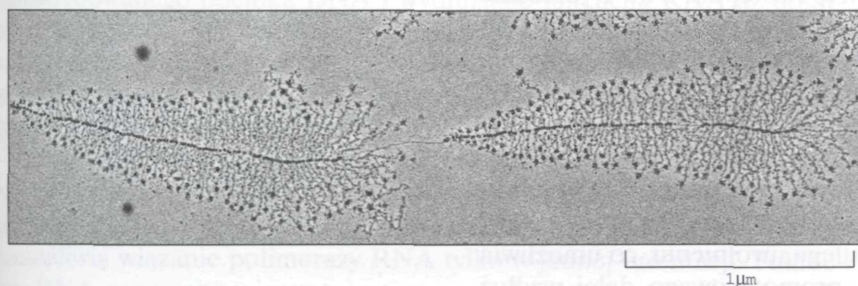
produkt: przed przyłączeniem nowego nukleotydu nie sprawdzają one, czy nukleotyd poprzednio przyłączony tworzy poprawną parę z nukleotydem matrycy (rys. 6-18), dzięki czemu polimerazy RNA nie wymagają startera do zainicjowania syntezy nowych łańcuchów RNA. Brak mechanizmu sprawdzającego jest odzwierciedleniem faktu, że transkrypcja nie *musi przebiegać z tak dużą wiernością jak replikacja DNA, ponieważ* RNA nie jest wykorzystywany w komórkach do trwałego przechowywania informacji. Polimerazy RNA błędnie wprowadzają przeciętnie jeden nukleotyd na 10^4 wprowadzonych poprawnie, co warto porównać z częstością błędów podczas replikacji, wynoszącą 1 na 10^7 nukleotydów.

Pytanie 7-2. Czy na mikrografii pokazanej na rys. 7-8 polimerazy RNA przesuwają się od strony prawej do lewej, czy odwrotnie? Dlaczego transkrypty RNA są tak znacznie krótsze od kodującego je DNA?

Komórki wytwarzają kilka rodzajów RNA

Ogromna większość genów zawartych w komórkowym DNA dyktuje sekwencje aminokwasów w białkach, a cząsteczki RNA (które bezpośrednio kierują syntezą białek) transkrybowane z takich genów nazywa się **informacyjnymi RNA** (**mRNA** — ang. **m**essenger **RNA**). Końcowym produktem innych genów jest jednak tylko RNA (tab. 7-1). Jak zobaczymy w dalszej części tego rozdziału, nieinformacyjne RNA służą — podobnie jak białka — jako strukturalne i enzymatyczne składniki komórek i pełnią kluczowe funkcje podczas translacji. Tak więc *rybosomowe RNA (rRNA)* stanowią rdzeń rybosomów, na których mRNA ulegają translacji do białek, a *transportujące (transferowe) RNA (tRNA)* działają jako cząsteczki adaptorowe, które dokonują selekcji aminokwasów i wprowadzają je do białek w kolejności zgodnej z instrukcjami zawartymi w mRNA.

Typowe cząsteczki DNA są bardzo długie i zawierają informacje dotyczące syntezy tysięcy różnych białek, cząsteczki RNA zaś są znacznie



Rys. 7-8. Transkrypcja dwóch genów uwidoczniona w mikroskopie elektronowym. Mikrografia przedstawia liczne cząsteczki polimerazy RNA, równocześnie dokonujące transkrypcji każdego z dwóch sąsiadujących ze sobą genów. Cząsteczki polimerazy są widoczne jako seria kropek wzdłuż DNA zlewająca się w grubą linię. Łączące się z nimi transkrypty widoczne w postaci cienkich linii. Cząsteczki RNA (nazywane rRNA) pokazane na tym przykładzie w trakcie transkrypcji z genów — nie ulegają translacji do białek, są natomiast wykorzystywane bezpośrednio jako składniki rybosomów, na których zachodzi translacja. Cząstki widoczne na (wolnym) końcu 5' każdego transkryptu rRNA są, jak się wydaje, początkowymi stadiami składania się rybosomów. (Dzięki uprzejmości: Ulrich Scheer)

Tabela 7-1. Rodzaje RNA wytwarzanego w komórkach

Rodzaj RNA	Funkcja
mRNA	kodują białka
rRNA	stanowią część struktury rybosomu i uczestniczą w syntezie białka
tRNA	w procesie biosyntezy białka pośredniczą między mRNA i aminokwasami w odczytywaniu kodonów
snRNA	uczestniczą w splicingu pre-mRNA, transporcie białek do ER, oraz w innych procesach komórkowych

krótsze i noszą informacje pochodzące tylko z fragmentu DNA. Typowy mRNA w komórkach eukariotycznych zawiera informacje przepisane tylko z jednego genu, kodującego pojedyncze białko. W komórkach bakterii jeden mRNA często stanowi produkt transkrypcji kilku genów sąsiadujących ze sobą i dlatego zawiera instrukcje do syntezy kilku różnych białek.

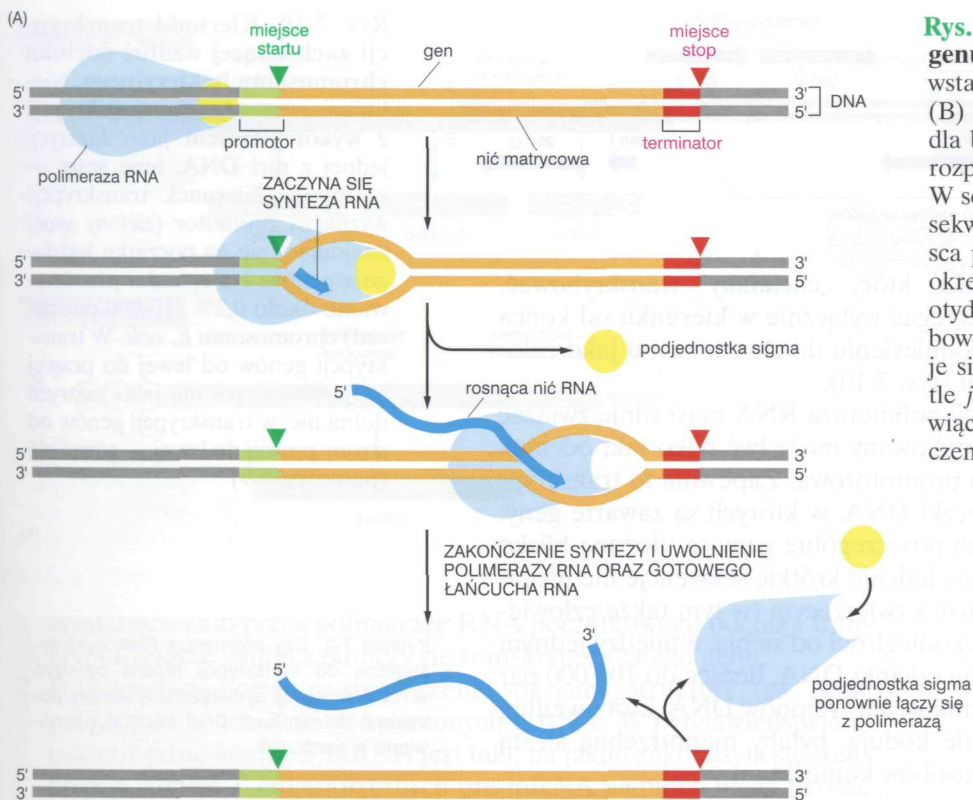
Sygnały na DNA informują polimerazę RNA, od którego miejsca rozpocząć transkrypcję i gdzie ją zakończyć

Aby rozpocząć transkrypcję, polimeraza RNA musi rozpoznać początek genu i ściśle związać się z DNA w tym miejscu. Sposób, w jaki polimerazy RNA rozpoznają miejsce startu transkrypcji, jest inny w komórkach prokariotycznych (bakterie) i inny w komórkach eukariotycznych. Sytuacja w komórkach bakteryjnych jest prostsza, od nich też rozpoczniemy omawianie procesu, a inicjację transkrypcji u eukariotów odłożymy do następnego rozdziału. Inicjacja transkrypcji jest dla komórek bardzo ważna, ponieważ stanowi główny punkt kontroli rodzaju i ilości syntetyzowanego białka.

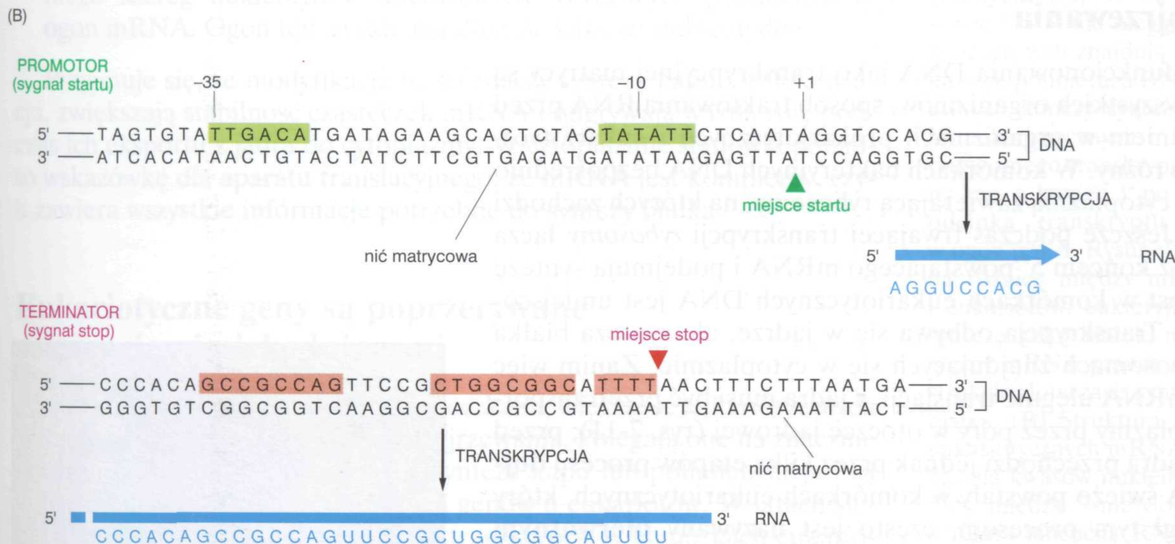
W komórkach bakteryjnych cząsteczka polimerazy RNA po napotkaniu DNA najpierw luźno z nim asocjuje, a następnie szybkim ruchem ślizgowym przesuwa się wzdłuż helisy DNA, aż napotka odcinek, zwany **miejscem promotorowym** (lub **promotorem**), z którym tworzy silny kompleks. Promotor zawiera sekwencje nukleotydowe stanowiące dla polimerazy RNA informację o miejscu startu transkrypcji. Polimeraza RNA rozpoznaje miejsce promotorowe, pomimo że DNA występuje w postaci dwuniciowej helisy, a to dzięki kontaktom z niektórymi atomami zasad, eksponowanymi w rowkach helikalnej struktury DNA.

Po wejściu w kontakt z miejscem promotorowym i utworzeniu z nim silnego kompleksu, polimeraza RNA rozplata od swego czoła dwuniciową helisę DNA, eksponując na krótkim odcinku każdego z łańcuchów niesparowane zasady (rys. 7-9A). Jeden z tych dwóch łańcuchów służy następnie jako matryca do tworzenia komplementarnych par zasad z wchodzącymi rybonukleotydami. Polimeraza RNA łączy dwa rybonukleotydy, rozpoczynając w ten sposób syntezę łańcucha RNA. Następnie trwa wydłużanie łańcucha, aż do chwili, gdy enzym napotka na DNA sygnał terminacji (lub inaczej sygnał „stop"), w którym polimeraza zatrzymuje się i uwalnia zarówno matrycę DNA, jak i nowo utworzony łańcuch RNA (rys. 7-9B).

Za rozpoznanie promotorowych sekwencji na DNA odpowiada przede wszystkim podjednostka bakteryjnej polimerazy RNA, zwana podjednostką (lub czynnikiem) *sigma* (σ). Po silnym związaniu się polimerazy z promotorem i zsyntetyzowaniu przez nią krótkiego (ok. 10 nukleotydów) odcinka RNA, podjednostka sigma ulega uwolnieniu, co umożliwia polimerazie przesuwanie się od miejsca promotorowego dalej wzdłuż

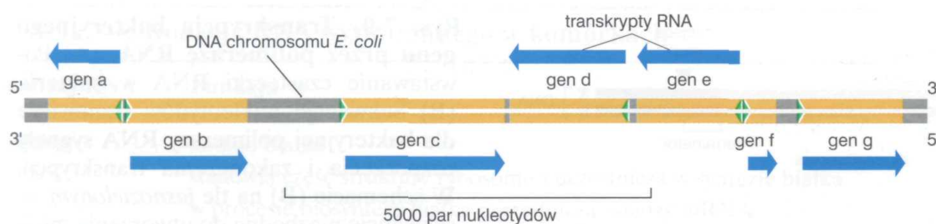


Rys. 7-9. **Transkrypcja bakteryjnego genu przez polimerazę RNA.** (A) Powstawanie cząsteczki RNA w bakterii. (B) Sekwencje nukleotydów stanowiące dla bakteryjnej polimerazy RNA sygnały rozpoczęcia i zakończenia transkrypcji. W schemacie (B) na tle *jasnozielonym* — sekwencje niezbędne do utworzenia miejsca promotorowego (promotora). Liczby określają pozycje poszczególnych nukleotydów, liczone od pierwszego transkrybowanego nukleotydu, któremu przypisuje się numer +1. W dolnej części (B) na tle *jasnoczerwonym* — sekwencje stanowiące dla polimerazy RNA sygnał zakończenia transkrypcji



transkrybowanego odcinka DNA i wydłużanie łańcucha RNA aż do sygnału terminacji. Po dotarciu do sygnału terminacji polimeraza RNA zostaje uwolniona, ponownie łączy się z wolną podjednostką sigma i poszukuje nowego promotora, od którego ponownie może rozpocząć proces transkrypcji.

Ponieważ DNA jest dwuniciowy, w zasadzie z każdego genu mogłyby być transkrybowane dwie cząsteczki RNA, po jednej z każdej nici DNA działającej jako matryca. Miejsce promotorowe jest jednak asymetryczne i umożliwia wiązanie polimerazy RNA tylko w jednej orientacji. Polimeraza RNA, raz poprawnie usytuowana na miejscu promotorowym, nie ma



Rys. 7-10. Kierunki transkrypcji zachodzącej wzdłuż odcinka chromosomu bakteryjnego. Niektóre geny ulegają transkrypcji z wykorzystaniem jako matrycy jednej z nici DNA, inne geny — z drugiej. Kierunek transkrypcji wyznacza promotor (*zielony grot*) znajdujący się na początku każdego z genów. Na rysunku przedstawiono około 0,2% (10 000 par zasad) chromosomu *E. coli.* W transkrypcji genów od lewej do prawej jest wykorzystywana jako matryca dolna nić, w transkrypcji genów od strony prawej do lewej — górna nić (patrz rys. 7-9)

możliwości wyboru łańcucha DNA, który „chciałaby" transkrybować, gdyż wydłużanie RNA może przebiegać wyłącznie w kierunku od końca 5′ do 3′. Kierunek transkrypcji w odniesieniu do chromosomu jako całości ulega zmianie od genu do genu (rys. 7-10).

Przed rozpoczęciem transkrypcji polimeraza RNA musi silnie związać się z DNA. Oznacza to, że transkrybowany może być tylko taki odcinek DNA, który poprzedza sekwencja promotorowa. Zapewnia to transkrypcję wyłącznie tych rejonów cząsteczki DNA, w których są zawarte geny. W genomie komórek bakteryjnych poszczególne geny są ułożone blisko siebie, a pomiędzy nimi znajdują się jedynie krótkie sekwencje nie ulegające transkrypcji. W DNA roślinnym i zwierzęcym (w tym także człowieka) geny są umiejscowione w dużej odległości od siebie, a między jednym genem a drugim znajdują się długie odcinki DNA, liczące do 100 000 par zasad. Transkrypcja tych „przerywnikowych" rejonów DNA, które według dotychczasowej wiedzy niczego nie kodują, byłaby niepotrzebną stratą materiałowych i energetycznych zasobów komórki.

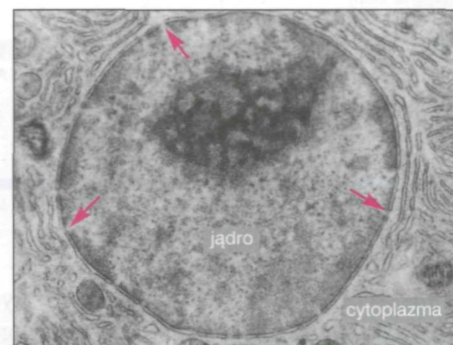
Pytanie 7-3. Czy polimerazę RNA wykorzystywaną do transkrypcji można by użyć w roli polimerazy syntetyzującej startery potrzebne do replikacji DNA (replikację omówiono w rozdz. 6)?

Eukariotyczne RNA podlegają w jądrze komórkowym procesom dojrzewania

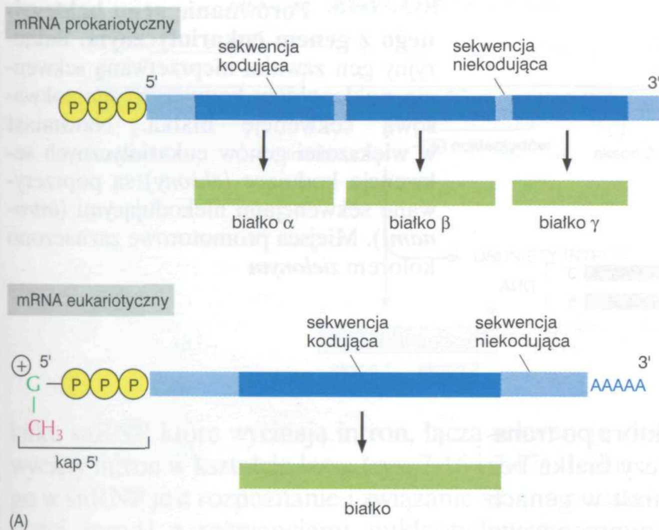
Chociaż reguły funkcjonowania DNA jako transkrypcyjnej matrycy są jednakowe dla wszystkich organizmów, sposób traktowania RNA przed jego wykorzystaniem w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych jest bardzo różny. W komórkach bakteryjnych DNA bezpośrednio kontaktuje się z cytoplazmą zawierającą rybosomy, na których zachodzi synteza białek. Jeszcze podczas trwającej transkrypcji *rybosomy* łączą się natychmiast z końcem 5′ powstającego mRNA i podejmują syntezę białka. Natomiast w komórkach eukariotycznych DNA jest umiejscowiony w jądrze. Transkrypcja odbywa się w jądrze, ale synteza białka zachodzi na rybosomach znajdujących się w cytoplazmie. Zanim więc eukariotyczny mRNA ulegnie translacji, z jądra musi być przetransportowany do cytoplazmy przez pory w otoczce jądrowej (rys. 7-11); przed opuszczeniem jądra przechodzi jednak przez kilka etapów procesu **dojrzewania**. RNA świeżo powstały w komórkach eukariotycznych, który jeszcze nie uległ tym procesom, często jest nazywany **pierwotnym transkryptem**.

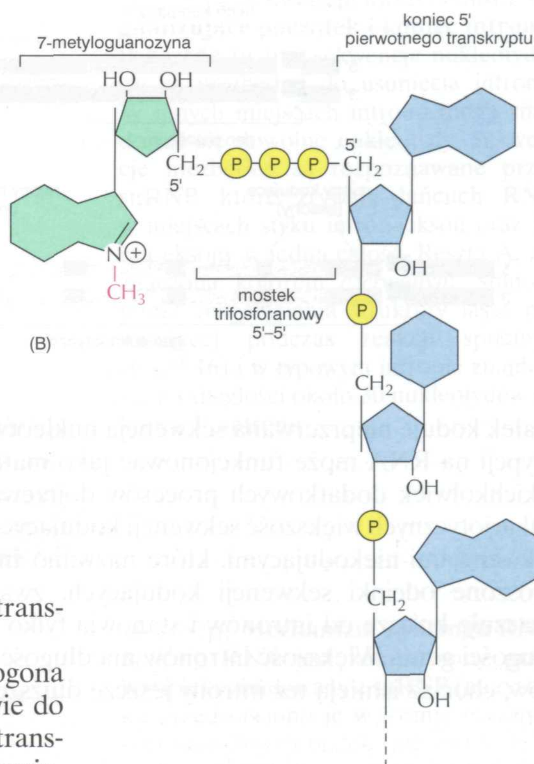
Zależnie od rodzaju powstającego RNA, pierwotne transkrypty przed opuszczeniem jądra ulegają różnym procesom dojrzewania. Pierwotne transkrypty, z których mają powstać mRNA, **(pre-mRNA)** podlegają dwóm procesom dojrzewania, polegającym na syntezie blokady na końcu 5′ (synteza tzw. *kapu*, ang. cap — czapka) oraz *poliadenylacji* na końcu 3′ (rys. 7-12):

1. Modyfikacja końca 5′ pierwotnego transkryptu, czyli końca, od którego rozpoczyna się synteza RNA, polega na przyłączeniu guanozyny (poprzez mostek trifosforanowy) do nukleotydu znajdującego się na początku transkryptu i następnie metylacji tego nukleozydu, co prowadzi do struktury zwanej kapem. Proces ten następuje wkrótce po



Rys. 7-11. Przekrój jądra komórki wątroby pokazujący pory jądrowe (*strzałki*). Cząsteczki mRNA powstają w jądrze i muszą przedostać się przez pory w otoczce jądrowej do cytoplazmy, gdzie ulegają translacji. (Z: D.W. Fawcett, *A Textbook of Histology*, 11th ed., Philadelphia: Saunders, 1986)





zsyntetyzowaniu przez polimerazę RNA początkowego odcinka transkryptu, jeszcze zanim zakończy się transkrypcja całego genu.

2. Poliadenylacja polega na przyłączeniu specjalnej struktury, tzw. ogona poli(A), do końca 3′ nowo tworzonych mRNA. W przeciwieństwie do bakterii, gdzie koniec 3′ mRNA jest taki, na jakim zakończyła się transkrypcja, koniec 3′ eukariotycznych pre-mRNA najpierw ulega przycięciu przez enzym rozcinający transkrypt w miejscu określonym przez szczególną sekwencję nukleotydów, a następnie inny enzym dołącza do niego szereg nukleotydów adenylowych, tworzących poliadenylowy ogon mRNA. Ogon ten zwykle ma długość kilkuset nukleotydów.

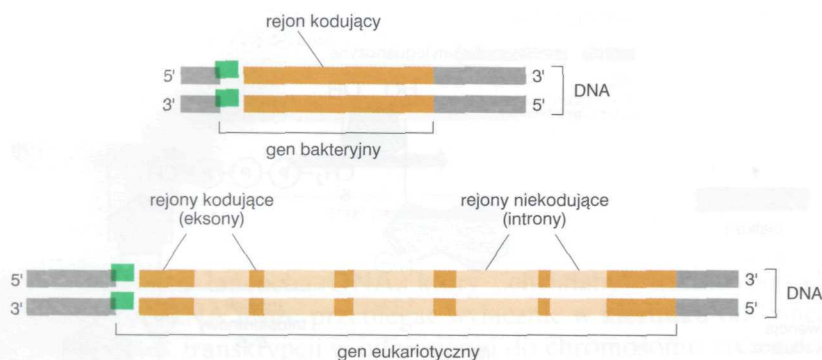
Przyjmuje się, że modyfikacje te, to znaczy synteza kapu i polidenylacja, zwiększają stabilność cząsteczek mRNA i odgrywają ważną rolę podczas ich eksportu z jądra do cytoplazmy. W cytoplazmie stanowią ponadto wskazówkę dla aparatu translacyjnego, że mRNA jest kompletny, czyli zawiera wszystkie informacje potrzebne do syntezy białka.

Rys. 7-12. Porównanie struktury mRNA prokariotycznych i eukariotycznych. (A) W bakteryjnych mRNA końce 5′ i 3′ nie ulegają modyfikacji. Na końcach tych znajdują się nukleotydy, od których polimeraza RNA rozpoczyna i na których kończy syntezę łańcucha RNA. W eukariotycznych mRNA do końca 5′ pierwotnego transkryptu zostaje dołączony kap, a koniec 3′ po odcięciu pewnego odcinka transkryptu — zaopatrzony w ogon poliA. Rysunek ilustruje także inną różnicę między mRNA prokariotów i eukariotów: bakteryjny mRNA koduje syntezę kilku białek, natomiast eukariotyczny mRNA prawie zawsze zawiera instrukcje dotyczące syntezy tylko jednego białka. (B) Struktura kapu na końcu 5′ eukariotycznych mRNA. Zauważ niezwykłe dla kwasów nukleinowych połączenie 5′-5′ między 7-metyloguanozyną (m^7G) a resztą łańcucha RNA. Wiele eukariotycznych mRNA ulega dodatkowej modyfikacji, polegającej na metylacji grupy 2′-hydroksylowej w drugiej reszcie rybozy (nie pokazano)

Eukariotyczne geny są poprzerywane sekwencjami niekodującymi

Zanim staną się funkcjonalnymi cząsteczkami, większość eukariotycznych RNA musi ulec dalszym procesom dojrzewania. Polegają one na znacznie bardziej radykalnych zmianach niż synteza kapu lub poliadenylacja i są konsekwencją zadziwiającej aranżacji genów u eukariotów. W latach siedemdziesiątych biologów badających transkrypcję w komórkach eukariotycznych zaskoczył fakt, że RNA zawarty w jądrze zachowywał się inaczej niż mRNA komórek bakteryjnych. Stwierdzili, że jądrowy RNA, który na podstawie kapu i poliadenylowych ogonów można było zidentyfikować jako przyszły mRNA, stawał się w jądrze stopniowo coraz krótszy, chociaż zachowywał na swoich końcach wprowadzone poprzednio modyfikacje. Do cytoplazmy dostawało się ostatecznie zaledwie około 5% ogólnego RNA powstającego w jądrze. Wydawało się to nie tylko wielkim marnotrawstwem, ale było też bardzo zagadkowe: w jaki sposób wewnętrzne rejony cząsteczki RNA mogły się skurczyć?

To dziwne zjawisko wyjaśniono w 1977 r. nieoczekiwanie odkrywając, że organizacja genów w komórkach eukariotycznych jest zasadniczo inna niż w komórkach prokariotycznych. W komórkach bakteryjnych większość



Rys. 7-13. Porównanie genu bakteryjnego z genem eukariotycznym. Bakteryjny gen zawiera nieprzerwaną sekwencję nukleotydów kodujących aminokwasową sekwencję białka. Natomiast w większości genów eukariotycznych sekwencje kodujące (*eksony*) są poprzerywane sekwencjami niekodującymi (*intronami*). Miejsca promotorowe zaznaczono kolorem *zielonym*

białek koduje nieprzerwana sekwencja nukleotydów DNA, która po transkrypcji na RNA może funkcjonować jako matryca do syntezy białka bez jakichkolwiek dodatkowych procesów dojrzewania. Natomiast w genach eukariotycznych większość sekwencji kodujących białko jest poprzerywana sekwencjami niekodującymi, które nazwano **intronami** (rys. 7-13). Rozproszone odcinki sekwencji kodujących, zwane **eksonami**, zwykle są znacznie krótsze od intronów i stanowią tylko niewielką część całkowitej długości genu. Większość intronów ma długość od 80 do 10 000 nukleotydów, chociaż istnieją też introny jeszcze dłuższe (rys. 7-14).

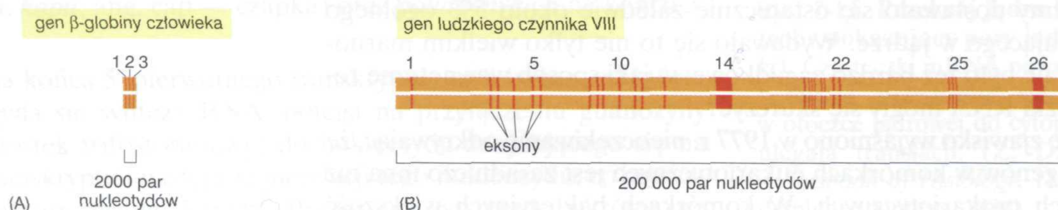
Introny są usuwane z RNA w procesie splicingu

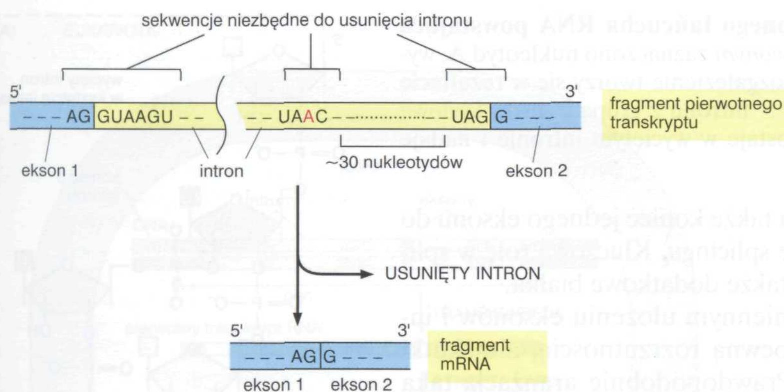
Synteza funkcjonalnego mRNA w komórkach eukariotycznych zaczyna się od przepisania całego genu (a więc eksonów i intronów) na długą cząsteczkę RNA, stanowiącą tzw. pierwotny transkrypt, w którym na przemian rozmieszczone są sekwencje eksonowe i intronowe. Po zsyntetyzowaniu kapu i poliadenylacji, ale jeszcze przed eksportem RNA z jądra do cytoplazmy, wszystkie sekwencje intronowe zostają usunięte, a eksony połączone w jedną całość. W rezultacie powstaje znacznie krótsza cząsteczka RNA, zawierająca nieprzerwanie ciągłą sekwencję kodującą. Proces ten nazywa się **splicingiem** (czyt. *splajsingiem*) **RNA**. Po zakończeniu splicingu cząsteczka RNA staje się funkcjonalnym informacyjnym RNA (mRNA), który teraz może opuścić jądro i uczestniczyć w translacji.

Po czym komórka rozpoznaje te części pierwotnego transkryptu, które należy usunąć? Przeciwnie niż w przypadku kodujących sekwencji eksonowych, wydaje się, że sekwencje intronowe są mało istotne, a większość różnych intronów wykazuje małe wzajemne podobieństwo. Każdy intron zawiera jednak pewne krótkie sekwencje nukleotydowe, stanowiące sygnał do jego usuwania. Sekwencje te są zlokalizowane na końcach lub w pobliżu końców intronu i są bardzo podobne w różnych intronach (rys. 7-15).

Introny są usuwane z RNA z udziałem enzymów, które w odróżnieniu od większości innych enzymów, są kompleksami białek i RNA; nazywamy je **małymi jądrowymi rybonukleoproteinami (snRNP**, ang. **s**mall **n**uclear ribonucleoprotein). Na RNA przy każdym z intronów organizuje się grupa

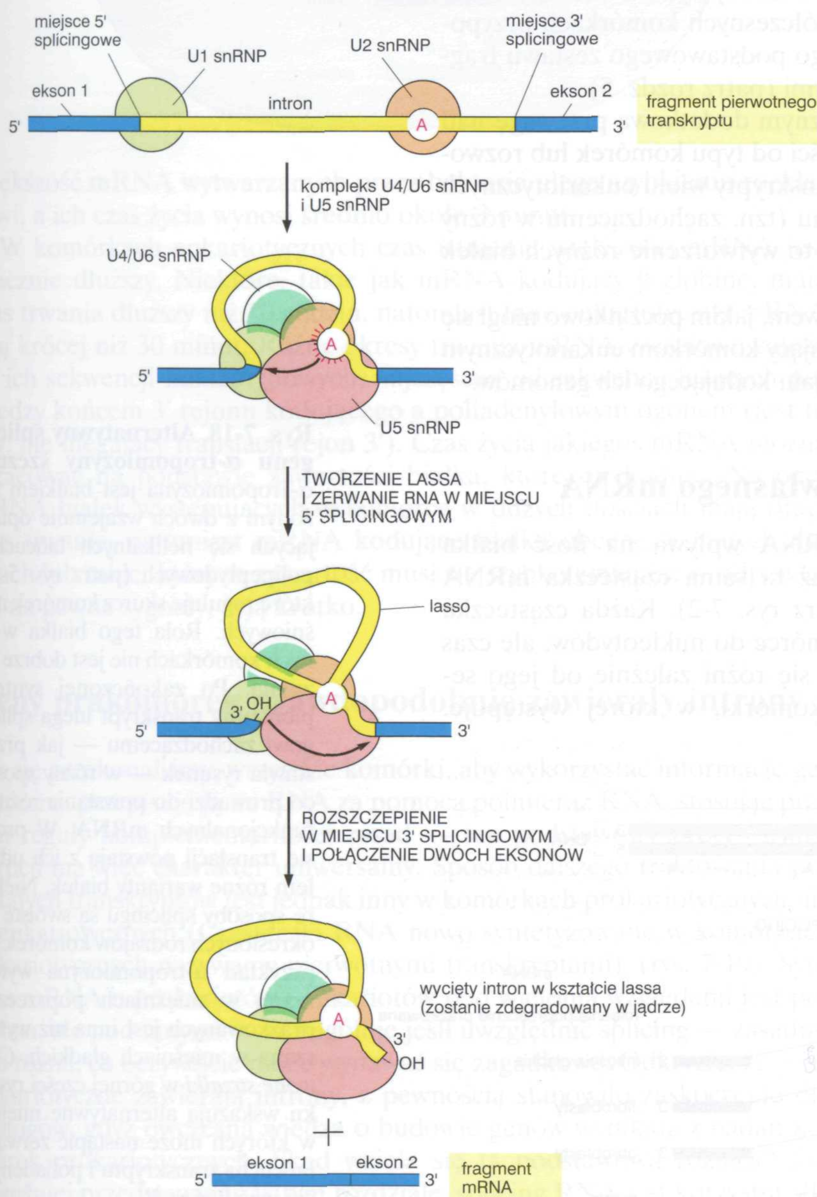
Rys. 7-14. Struktura dwóch genów człowieka, pokazująca aranżację eksonów i intronów. (A) Sekwencję nukleotydową genu β-globiny, kodującego jedną z podjednostek hemoglobiny, białka przenoszącego tlen, pokazano na rys. 6-9. Gen ten zawiera 3 eksony. (B) Gen czynnika VIII, kodujący białko (czynnik VIII) uczestniczące w procesie krzepnięcia krwi. Mutacje w tym bardzo dużym genie są odpowiedzialne za najczęściej występującą formę hemofilii. Jak zaznaczono, gen ten zawiera 26 eksonów





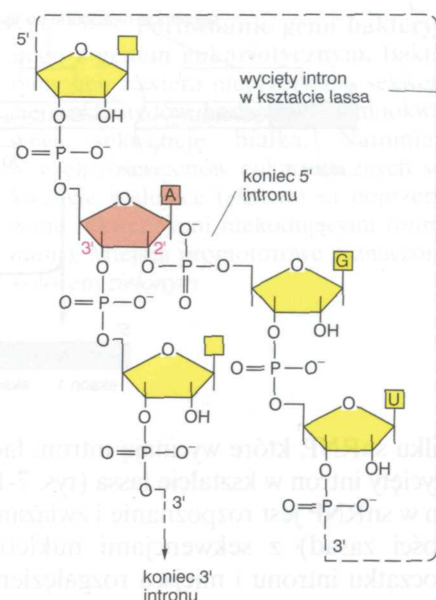
Rys. 7-15. Sekwencje nukleotydowe sygnalizujące początek i koniec intronu. Pokazane tu trzy sekwencje nukleotydowe są niezbędne do usunięcia intronu. W innych miejscach intronu mogą znajdować się dowolne nukleotydy. Sekwencje niezbędne są rozpoznawane przez snRNP, które zrywają łańcuch RNA w miejscach styku intron–ekson oraz łączą eksony w jedną całość. Reszta A, zaznaczona kolorem *czerwonym*, stanowi punkt rozgałęzienia struktury lassa powstającej podczas reakcji splicingu (rys. 7-16) i w typowym intronie znajduje się w odległości około 30 nukleotydów od końca 3′ intronu

kilku snRNP, które wycinają intron, łączą sekwencje eksonowe i uwalniają wycięty intron w kształcie lassa (rys. 7-16 i 7-17). Jedną z ról RNA zawartego w snRNP jest rozpoznanie i związanie się (na podstawie komplementarności zasad) z sekwencjami nukleotydowymi stanowiącymi znaczniki początku intronu i miejsca rozgałęzienia (patrz rys. 7-16). Cząstki snRNP



Rys. 7-16. Mechanizm splicingu RNA. Splicing RNA jest katalizowany przez kompleks zbudowany z snRNP (na rysunku przedstawiono je w formie *barwnych kół*) oraz innych białek (nie uwidocznionych na rysunku), razem tworzących spliceosom. Jedna z funkcji spliceosomu polega na zbliżeniu do siebie dwóch końców intronu, co umożliwia reakcję. Po związaniu się snRNP z odpowiednimi miejscami pre-mRNA szczególna reszta adeniny (zaznaczona kolorem *czerwonym*) atakuje miejsce splicingowe 5′ i zrywa w tym miejscu łańcuch cukrowo-fosforanowy RNA. Koniec 5′ odciętego intronu zostaje kowalencyjnie połączony z nukleotydem adenylowym, tworząc w cząsteczce RNA pętlę, określaną jako *lasso* (patrz rys. 7-17). Wolna grupa OH na końcu 3′ pierwszego eksonu reaguje następnie z początkiem sekwencji drugiego eksonu, równocześnie uwalniając koniec 3′ intronu i kowalencyjnie łącząc dwa eksony. Końcowym wynikiem reakcji splicingowych jest połączenie eksonów w jedną ciągłą sekwencję kodującą oraz usunięcie w kształcie lassa intronu, który ulegnie degradacji

Rys. 7-17. Struktura rozgałęzionego łańcucha RNA powstająca podczas splicingu. Kolorem *czerwonym* zaznaczono nukleotyd A, wyróżniony już na rys. 7-15 i 7-16. Rozgałęzienie tworzy się w rezultacie kowalencyjnego połączenia końca 5′ intronu z grupą 2′-hydroksylową adenozyny. Rozgałęzienie to pozostaje w wyciętym intronie i nadaje mu kształt lassa (patrz rys. 7-16)



zbliżają następnie obydwa końce intronu, a także koniec jednego eksonu do początku następnego, co umożliwia zajście splicingu. Kluczową rolę w splicingu odgrywają snRNP, ale konieczne są także dodatkowe białka.

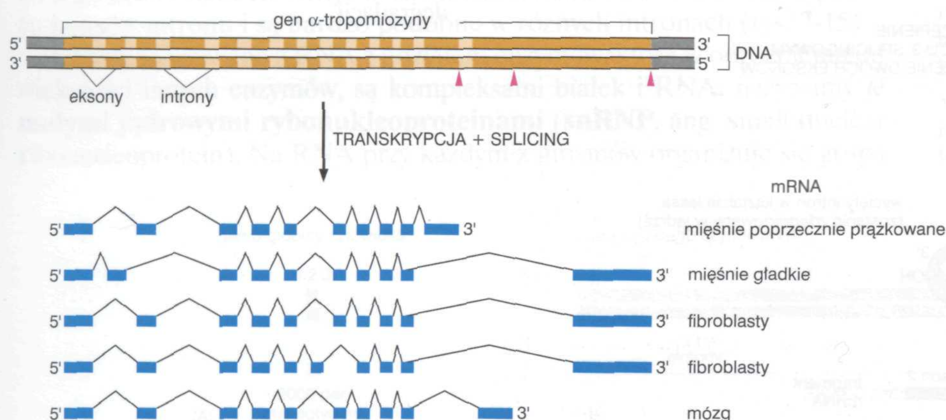
Aranżacja genów polegająca na przemiennym ułożeniu eksonów i intronów początkowo może wydawać się pewną rozrzutnością, ale skutki tego są dla komórki bardzo korzystne. Prawdopodobnie aranżacja taka miała duże znaczenie we wczesnych etapach ewolucji genów, gdyż znakomicie przyspieszyła pojawienie się nowych, korzystnych białek. Obecność licznych intronów w DNA zwiększa prawdopodobieństwo rekombinacji (patrz rozdz. 9) eksonów różnych genów. Oznacza to, że geny nowych białek mogły ewoluować całkiem szybko poprzez kombinacyjne łączenie fragmentów genów istniejących wcześniej, co przypomina konstruowanie nowego typu maszyny z zestawu poprzednio istniejących elementów funkcjonalnych. Istotnie, wiele białek we współczesnych komórkach przypomina składankę skomponowaną z pewnego podstawowego zestawu fragmentów, nazywanych *domenami* białkowymi (patrz rozdz. 5).

Splicing nadaje komórkom eukariotycznym dodatkową przewagę nad komórkami prokariotycznymi. W zależności od typu komórek lub rozwojowego stadium organizmu, pierwotne transkrypty wielu eukariotycznych genów ulegają splicingowi alternatywnemu (tzn. zachodzącemu w różny sposób), dając różne mRNA. Umożliwia to wytworzenie różnych białek z tego samego genu (rys. 7-18).

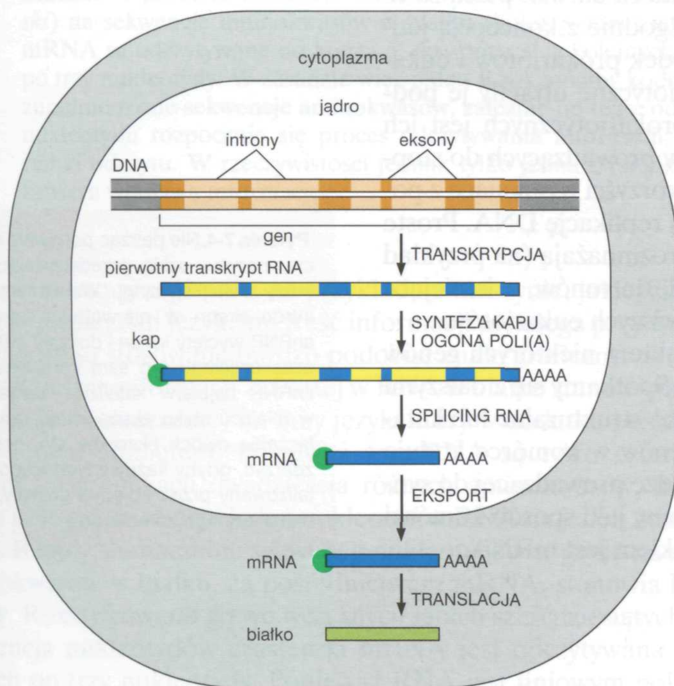
Splicing RNA nie jest więc marnotrawstwem, jakim początkowo mógł się wydawać, ale stanowi mechanizm umożliwiający komórkom eukariotycznym dalsze zwiększenie i tak ogromnego potencjału kodującego ich genomów.

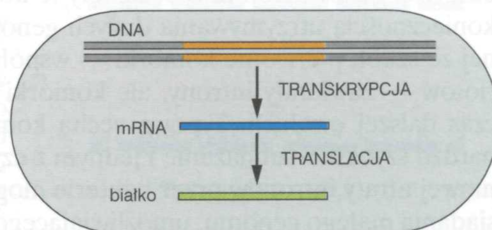
Komórki degradują cząsteczki własnego mRNA

Czas istnienia w komórce jakiegoś mRNA wpływa na ilość białka wytwarzanego z jego udziałem, ponieważ ta sama cząsteczka mRNA może wielokrotnie ulegać translacji (patrz rys. 7-2). Każda cząsteczka mRNA jest ostatecznie rozkładana w komórce do nukleotydów, ale czas życia różnych cząsteczek RNA znacznie się różni zależnie od jego sekwencji nukleotydowej oraz od typu komórki, w której występuje.



Rys. 7-18. Alternatywny splicing genu α-tropomiozyny szczura. α-Tropomiozyna jest białkiem złożonym z dwóch wzajemnie oplatających się helikalnych łańcuchów polipeptydowych (patrz rys. 5-11), które reguluje skurcz komórek mięśniowych. Rola tego białka w innych komórkach nie jest dobrze poznana. Po zakończonej syntezie pierwotny transkrypt ulega splicingowi zachodzącemu — jak przedstawia rysunek — w różny sposób, co prowadzi do powstania różnych funkcjonalnych mRNA. W procesie translacji powstają z ich udziałem różne warianty białek. Niektóre sposoby splicingu są swoiste dla określonych rodzajów komórek. Na przykład α-tropomiozyna wytwarzana w mięśniach poprzecznie prążkowanych jest inna niż wytwarzana w mięśniach gładkich. *Czerwone strzałki* w górnej części rysunku wskazują alternatywne miejsca, w których może nastąpić zerwanie łańcucha transkryptu i poliadenylacja jego końca 3′





Rys. 7-19. Streszczenie etapów prowadzących od genu do białka. Ostateczny poziom jakiegoś białka w komórce zależy od wydajności każdego z etapów oraz od szybkości degradacji cząsteczek RNA i białka. (A) Pierwotne transkrypty syntetyzowane w komórkach eukariotycznych zawierają sekwencje eksonowe i intronowe. Obydwa końce ulegają modyfikacji, a introny zostają usunięte w procesie splicingu, katalizowanym przez enzymy. Powstały mRNA jest następnie transportowany z jądra do cytoplazmy, gdzie ulega translacji do białka. Chociaż rysunek przedstawia te procesy jako ciąg następujących po sobie zdarzeń, w rzeczywistości niektóre z nich często przebiegają równocześnie. Na przykład kap jest syntetyzowany jeszcze przed zakończeniem transkrypcji. (B) Powstawanie cząsteczek mRNA w komórkach prokariotycznych jest prostsze. Końce 5′ i 3′ transkryptu nie ulegają żadnym modyfikacjom, są więc takie, jakie powstały podczas inicjacji i terminacji transkrypcji. Ponieważ prokariota nie mają jądra, transkrypcja i translacja odbywają się w jednym przedziale komórkowym. W rzeczywistości translacja bakteryjnego mRNA często rozpoczyna się przed zakończeniem transkrypcji

Większość mRNA wytwarzanych przez bakterie ulega szybkiemu rozkładowi, a ich czas życia wynosi średnio około 3 minut.

W komórkach eukariotycznych czas istnienia większości mRNA jest znacznie dłuższy. Niektóre, takie jak mRNA kodujący β-globinę, mają czas trwania dłuższy niż 10 godzin, natomiast inne eukariotyczne mRNA żyją krócej niż 30 minut. Różne okresy trwania mRNA częściowo zależą od ich sekwencji nukleotydowych, najczęściej od sekwencji leżących pomiędzy końcem 3′ rejonu kodującego a poliadenylowym ogonem (jest to tzw. nie ulegający translacji rejon 3′). Czas życia jakiegoś mRNA można oszacować na podstawie zawartości białka, które on koduje. Na ogół mRNA białek występujących w komórce w dużych ilościach mają długi czas trwania, natomiast mRNA kodujące białka obecne w małych ilościach lub takie, których zawartość musi się szybko zmieniać w odpowiedzi na pewne sygnały, żyją krótko.

Geny prakomórek prawdopodobnie zawierały introny

Jak się przekonaliśmy, wszystkie komórki, aby wykorzystać informację genetyczną, przepisują ją na RNA za pomocą polimeraz RNA, stosując przy tym reguły komplementarności zasad — ten podstawowy proces transkrypcji ma więc charakter uniwersalny. Sposób dalszego traktowania powstałych transkryptów jest jednak inny w komórkach prokariotycznych niż w eukariotycznych (Cząsteczki RNA nowo syntetyzowane w komórkach eukariotycznych nazywamy pierwotnymi transkryptami), (rys. 7-19). Synteza mRNA u prokariotów i eukariotów pod wieloma względami jest podobna, ale pod innymi — szczególnie jeśli uwzględnić splicing — zasadniczo różna, co oczywiście może wydawać się zagadkowe. Odkrycie, że geny eukariotyczne zawierają introny, z pewnością stanowiło zaskoczenie dla biologów, gdyż ówczesna wiedza o budowie genów wynikała z badań komórek prokariotycznych. Skąd wzięła się ta podstawowa różnica? Jak wcześniej przedstawiono w tym rozdziale, splicing RNA jest korzystny dla

ewolucyjnej elastyczności oraz stwarza dodatkowe możliwości kontroli ekspresji genów. Komórki osiągnęły te korzyści nie za darmo: płacą za to koniecznością utrzymywania dużych genomów. Zgodnie z koncepcją jednej ze szkół, pierwotne komórki — wspólny przodek prokariotów i eukariotów — zawierały introny, ale komórki prokariotyczne utraciły je podczas dalszej ewolucji. Typową cechą komórek prokariotycznych jest ich bardzo szybkie rozmnażanie i jednym z czynników prowadzących do stopniowej utraty intronów przez bakterie mogły być korzyści wynikające z posiadania małego genomu, umożliwiającego szybką replikację DNA. Proste organizmy eukariotyczne, które także szybko się rozmnażają (na przykład niektóre drożdże), zawierają stosunkowo niewiele intronów, a istniejące u nich introny zwykle są znacznie krótsze niż u wyższych eukariotów.

Wcześniej przedstawiono, że końcowym produktem niektórych genów jest tylko RNA, np. taki, jaki występuje w snRNP. Spotkamy się z dalszymi przykładami cząsteczek RNA funkcjonujących jako strukturalne lub katalityczne składniki komórek. Jednak większość genów w komórce koduje RNA, które stanowią cząsteczki pośrednie na drodze prowadzącej do syntezy białek. Następna część rozdziału przedstawia, w jaki sposób komórki przekształcają w białka informacje, których nośnikiem jest mRNA.

Pytanie 7-4. Nie patrząc ponownie na ilustracje, narysuj szkic przedstawiający istotne etapy reakcji splicingu. Wskaż miejsca styku intron–ekson w pierwotnym transkrypcie, snRNP, wycięty intron i dojrzały mRNA. Podczas splicingu ten sam kompleks cząstek snRNP najpierw katalizuje zerwanie RNA w miejscu styku ekson–intron, a następnie łączenie dwóch eksonów. Co mogłoby się zdarzyć, gdyby każdy z tych etapów był katalizowany przez odrębne enzymy, nie tworzące jednego kompleksu?

Od RNA do białka

Pod koniec lat pięćdziesiątych biolodzy zgodnie przyjęli pogląd, że informacja zakodowana w DNA najpierw jest przepisywana na RNA, a następnie na białka. Dyskusja w tych latach koncentrowała się wokół problemu kodowania: w jaki sposób informacja zawarta w liniowej sekwencji nukleotydów RNA jest tłumaczona na liniową sekwencję zestawu całkowicie różnych pod względem chemicznym aminokwasów w białkach? To pasjonujące pytanie budziło wśród badaczy w tamtych czasach wiele emocjonujących dyskusji. Był oto kryptogram zapisany przez naturę, który po ponad trzech miliardach lat ewolucji mógł w końcu być rozszyfrowany przez jeden z produktów ewolucji — człowieka! Istotnie, nie tylko kod został krok po kroku ostatecznie rozszyfrowany, ale wyjaśniono też podstawowe elementy aparatu, za pomocą którego komórki wytwarzają białka.

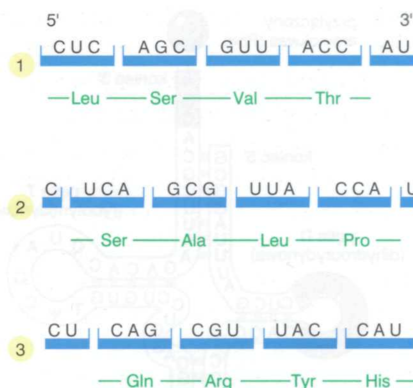
Informacja w mRNA jest zakodowana w postaci zestawów trójek nukleotydów

Po wytworzeniu mRNA komórka może wykorzystać zawartą w nim informację do syntezy białka. Sposób przekazywania informacji podczas transkrypcji daje się łatwo zrozumieć, ponieważ DNA i RNA są chemicznie i strukturalnie podobne, a DNA pełni rolę matrycy, dyktującej kolejność nukleotydów w syntetyzowanym na niej RNA. Określenie *transkrypcja*

	AGA									UUA					AGC					
	AGG									UUG					AGU					
GCA	CGA						GGA			CUA				CCA	UCA	ACA			GUA	
GCC	CGC						GGC		AUA	CUC				CCC	UCC	ACC			GUC	UAA
GCG	CGG	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUG	AAA		UUC	CCG	UCG	ACG		UAC	GUG	UAG
GCU	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU	GUU	UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V	

Rys. 7-20. Kod genetyczny. Jednoliterowe skróty nazw aminokwasów przedstawiono pod skrótami trzyliterowymi (wzory i pełne nazwy aminokwasów patrz panel 2-5, s. 62–63). Zgodnie z konwencją, sekwencje kodonów piszemy podając nukleotyd 5′-końcowy po lewej stronie. Zauważ, że większość aminokwasów ma więcej niż jeden kodon i że kodony jednego aminokwasu często zawierają takie same nukleotydy w pierwszej i drugiej pozycji, różnią się natomiast trzecią pozycją. Trzy kodony nie kodują żadnego aminokwasu, ale funkcjonują jako sygnały terminacji (kodony stop), informujące o końcu sekwencji kodującej białko. Jeden z kodonów — AUG działa jako kodon inicjujący, sygnalizujący początek informacji kodującej białko, a równocześnie jako kodon metioniny

Rys. 7-21. Trzy możliwe ramki odczytu sekwencji kodujących białko. W procesie translacji sekwencji nukleotydowej (kolor *niebieski*) na sekwencję aminokwasów w białku (kolor *zielony*) nukleotydy mRNA są odczytywane od końca 5′ do końca 3′ w kolejnych grupach po trzy nukleotydy. W zasadzie więc jeden RNA mógłby kodować trzy zupełnie różne sekwencje aminokwasów, zależnie od tego, od którego nukleotydu rozpocznie się proces odczytywania informacji, czyli od ramki odczytu. W rzeczywistości jednak tylko jedna z ramek odczytu zawiera właściwą informację.



znaczy to samo co przepisanie, na przykład na maszynie, jakiejś informacji pisanej ręcznie. Ani język, ani treść informacji nie ulega przy tym zmianie, a ponadto są stosowane bardzo podobne znaki graficzne.

Przekształcenie informacji zawartej w RNA w białko stanowi natomiast jej **translację** (tłumaczenie) na inny język, który w dodatku posługuje się zupełnie innym alfabetem. Ponieważ w mRNA są tylko cztery różne nukleotydy, a w białkach dwadzieścia różnych aminokwasów, translacja nie może polegać na relacji: jeden nukleotyd w RNA na jeden aminokwas w białku. Reguły tłumaczenia sekwencji nukleotydów w genie na sekwencję aminokwasów w białku, za pośrednictwem mRNA, stanowią **kod genetyczny**. Rozszyfrowano go we wczesnych latach sześćdziesiątych.

Sekwencja nukleotydów cząsteczki mRNA jest odczytywana kolejno w grupach po trzy nukleotydy. Ponieważ RNA jest liniowym polimerem czterech różnych nukleotydów, istnieje $4 \cdot 4 \cdot 4 = 64$ możliwych kombinacji trójek nukleotydów: AAA, AUA, AUG itd. W białkach występuje jednak tylko dwadzieścia aminokwasów. Albo więc niektóre kombinacje trzech nukleotydów nigdy nie są używane, albo kod zawiera nadmiar takich kombinacji i niektóre aminokwasy są kodowane przez więcej niż jedną trójkę nukleotydów (czyli kod jest zdegenerowany). Prawdziwa okazała się ta druga ewentualność; całkowicie rozszyfrowany kod genetyczny przedstawiono na rys. 7-20. Każdy zestaw trzech kolejnych nukleotydów nazywa się **kodonem** i koduje jeden aminokwas.

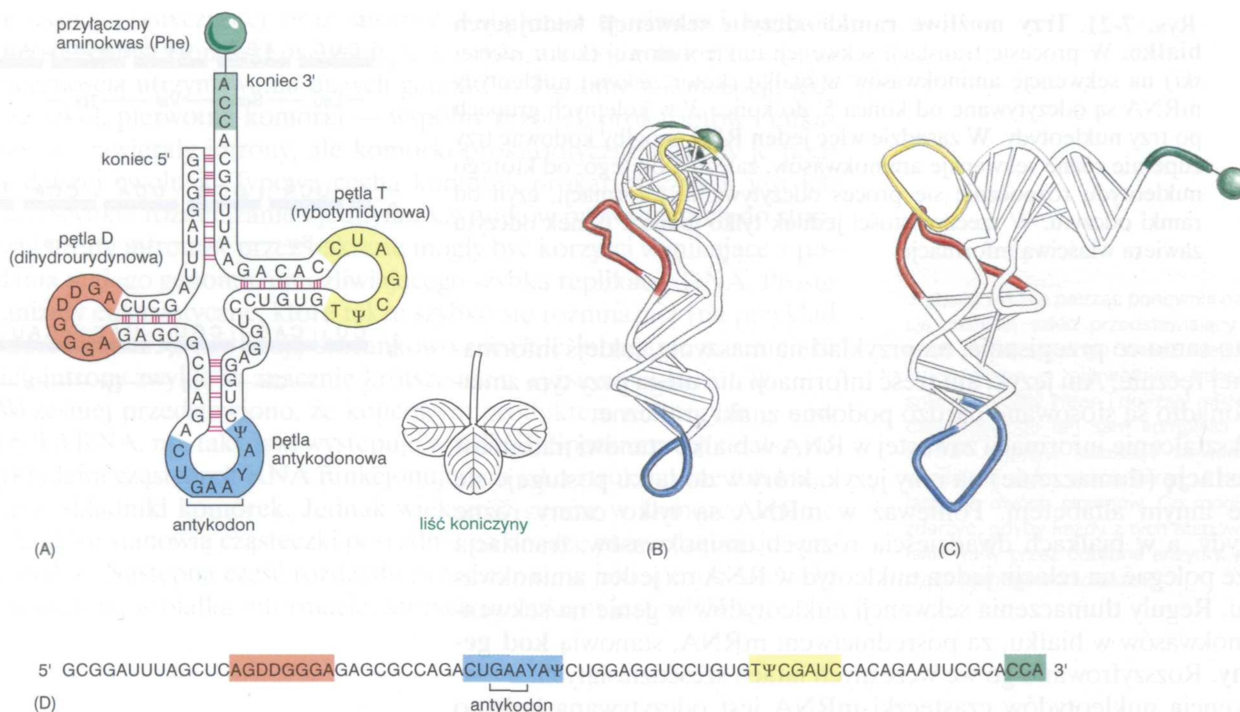
Kod ten jest uniwersalny, czyli jednakowy dla wszystkich współczesnych organizmów. Znaleziono wprawdzie kilka odchyleń od ogólnych reguł kodu, głównie w odniesieniu do DNA mitochondriów. Mitochondria mają swój własny system transkrypcji i system syntezy białka, działające niezależnie od reszty komórki (patrz rozdział 13) i do uniwersalnego skądinąd kodu genetycznego wprowadziły niewielkie zmiany.

Translacja sekwencji mRNA może w zasadzie zachodzić w każdej z trzech możliwych **ramek odczytu**, zależnie od miejsca, od którego rozpocznie się proces odczytywania (rys. 7-21), jednak tylko jedna z nich koduje potrzebne białko. W dalszym ciągu rozdziału zobaczymy, w jaki sposób poprawną ramkę odczytu wyznaczają specjalne sygnały, znajdujące się na początku każdego mRNA.

Pytanie 7-5. Kod genetyczny został rozszyfrowany w doświadczeniach, w których jako mRNA sterującego syntezą białka w bezkomórkowych ekstraktach użyto polinukleotydów o powtarzających się sekwencjach. Zastosowano takie warunki doświadczenia, które umożliwiają rozpoczęcie się translacji od dowolnego miejsca w cząsteczce RNA, to znaczy nie wymagające obecności kodonu inicjującego, który w żywych komórkach jest nieodzowny. Jakich rodzajów polipeptydów należałoby oczekiwać z doświadczeń tego typu, gdy jako matryc użyto polinukleotydów o powtarzających się sekwencjach — 1) UUUUUUUU..., 2) AUAUAUAU.... oraz 3) AUCAUCAUC...? (patrz kod genetyczny, rys. 7-20).

Cząsteczki tRNA dopasowują aminokwasy do kodonów mRNA

Kodony zawarte w mRNA nie rozpoznają bezpośrednio aminokwasów: grupa trzech nukleotydów nie może na przykład związać jakiegoś aminokwasu. Translacja mRNA zależy dlatego od cząsteczek adaptorowych, których jeden koniec rozpoznaje i wiąże się z kodonem, a drugi — z odpowiednim aminokwasem. Takimi adaptorami są niewielkie cząsteczki RNA, określane jako **transportujące** (lub **transferowe**) **RNA (tRNA)**, z których każdy jest zbudowany z ok. 80 nukleotydów.



Rys. 7-22. Cząsteczka tRNA. Cząsteczkę tRNA (w tym przypadku tRNA specyficznego dla fenyloalaniny) można graficznie przedstawić w różny sposób. (A) Struktura liścia koniczyny, umowny sposób stosowany do pokazania rejonów cząsteczki tworzących komplementarne pary zasad (*czerwone kreski*). Antykodon stanowią trzy kolejne nukleotydy tworzące pary z nukleotydami kodonu mRNA. Do końca 3′ cząsteczki tRNA zostaje dołączony aminokwas odpowiadający kodonowi rozpoznawanemu przez antykodon tRNA. Cząsteczki tRNA zawierają nietypowe zasady, powstające w wyniku potranskrypcyjnych modyfikacji pre-tRNA. Zasady określane jako Ψ (pseudourydyna) i D (dihydrourydyna) powstają z uracylu. (B i C) Model cząsteczki o kształcie litery L oparty na analizie struktury z wykorzystaniem dyfrakcji promieni rentgenowskich. (D) Liniowa sekwencja nukleotydowa cząsteczki tRNA; użyto kolorów jak na rys. A, B i C

Poprzednio już przekonaliśmy się, że cząsteczka RNA może ulec pofałdowaniu z utworzeniem trójwymiarowej struktury w rezultacie komplementarności par zasad różnych jej rejonów (patrz rys. 7-5). Jeśli rejony sparowane są dostatecznie duże, to tworzą dwuniciową strukturę helikalną, podobnie jak DNA. Typowym tego przykładem są tRNA. Cząsteczki tRNA tworzą cztery odcinki helikalne, które można schematycznie przedstawić w formie podobnej do liścia koniczyny (rys. 7-22 A). Na przykład, sekwencja 5′-GCUC-3′ jednej części łańcucha polinukleotydowego może stosunkowo silnie asocjować i tworzyć helisę z sekwencją 5′-GAGC-3′ innej części tej samej cząsteczki. Struktura liścia koniczyny ulega dalszemu pofałdowaniu z utworzeniem przestrzennie zwartej struktury o kształcie litery L, stabilizowanej przez dodatkowe wiązania wodorowe pomiędzy różnymi rejonami cząsteczki (rys. 7-22).

Dla spełniania funkcji tRNA podczas biosyntezy białka, bardzo istotne są dwa rejony niesparowanych nukleotydów, znajdujące się po przeciwnych stronach cząsteczki o kształcie litery L. Jeden z tych rejonów to **antykodon**, którym są trzy kolejne nukleotydy tworzące komplementarne pary z nukleotydami jednego z kodonów w cząsteczce mRNA. Drugim ważnym rejonem jest krótki niesparowany odcinek na końcu 3′ cząsteczki — miejsce, do którego wiąże się aminokwas odpowiadający kodonowi rozpoznawanemu przez antykodon tej samej cząsteczki tRNA.

Jak już wcześniej wspomniano, kod genetyczny jest zdegenerowany, to znaczy kilka różnych kodonów może wprowadzać do białka ten sam aminokwas (patrz rys. 7-20). Z tego nadmiaru kodonów wynika, że dla każdego aminokwasu jest więcej niż jedna cząsteczka tRNA albo jedna cząsteczka tRNA może rozpoznawać więcej niż jeden kodon. W rzeczywistości mamy do czynienia z obydwiema sytuacjami. Niektóre aminokwasy mają więcej niż jeden tRNA, a niektóre tRNA są tak skonstruowane, że tworzą dokładne pary zasad tylko w dwóch pierwszych pozycjach kodonu i tolerują niedokładności w trzeciej pozycji (jest to tzw. reguła tolerancji lub chwiejności — ang. *wobble*). Reguła tolerancji wyjaśnia, dlaczego wymienne kodony jakiegoś aminokwasu różnią się najczęściej tylko trzecim nukleotydem (patrz rys. 7-20). Tolerancja w doborze trzeciej zasady kodonu umożliwia dopasowanie

20 aminokwasów do 61 kodonów aminokwasowych z wykorzystaniem zaledwie 31 rodzajów cząsteczek tRNA. Dokładna liczba rodzajów tRNA zmienia się jednak w zależności od gatunku organizmu.

Swoiste enzymy łączą tRNA z odpowiednimi aminokwasami

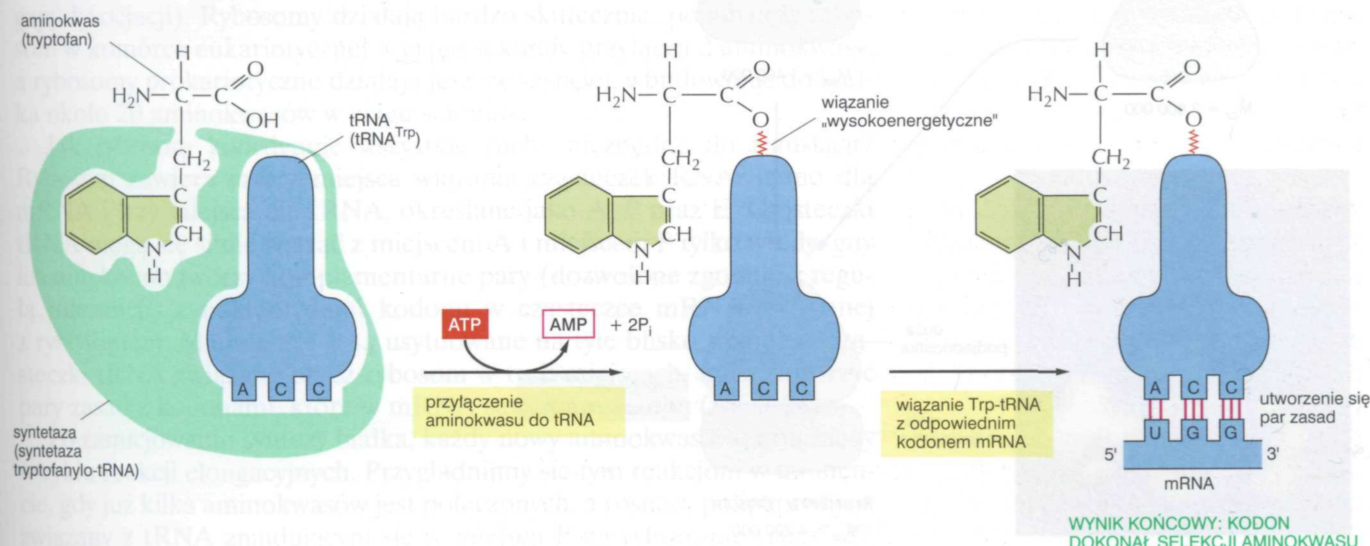
Wiemy już, że aby odczytywać kod genetyczny, komórki wytwarzają wiele różnych tRNA. Obecnie rozważymy, w jaki sposób cząsteczka tRNA zostaje połączona z tym spośród 20 aminokwasów, który jest jej specyficznym partnerem. Rozpoznanie i przyłączenie odpowiedniego aminokwasu do tRNA zależy od enzymów nazywanych syntetazami **aminoacylo-tRNA**, które kowalencyjnie łączą każdy z aminokwasów z odpowiednim dla niego tRNA. Dla każdego aminokwasu istnieje odrębna syntetaza (ogółem jest więc 20 syntetaz); jedna łączy glicynę ze wszystkimi tRNA rozpoznającymi kodony glicynowe, inna łączy alaninę z tRNA, które rozpoznają kodony alaninowe i tak dalej. Syntetazy aminoacylo-tRNA rozpoznają poprawny tRNA na podstawie niektórych nukleotydów w ramieniu aminokwasowym i antykodonowym. W procesie dekodowania (informacji genetycznej) syntetazy aminoacylo-tRNA są równie ważne jak tRNA, ponieważ tylko w rezultacie wspólnego działania obu takich cząsteczek do każdego kodonu cząsteczki mRNA można przypisać określony aminokwas (rys. 7-23).

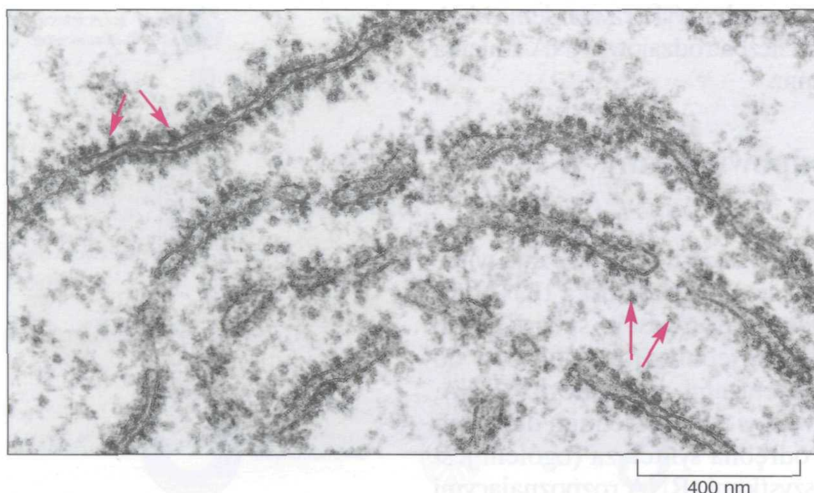
Reakcja wiązania aminokwasu z końcem 3′ tRNA, katalizowana przez syntetazę, jest sprzężona z uwalnianiem energii z ATP (rys. 3-27), podobnie jak w przypadku wielu innych reakcji zachodzących w komórce. Kosztem energii ATP powstaje bogate w energię wiązanie pomiędzy aminokwasem a tRNA. Energia tego wiązania jest wykorzystywana podczas późniejszego etapu syntezy białka do kowalencyjnego wiązania aminokwasów w łańcuch polipeptydowy.

Odczytywanie informacji zawartej w mRNA odbywa się na rybosomach

Rozpoznanie kodonu przez antykodon znajdujący się w tRNA odbywa się na podstawie reguły łączenia się komplementarnych zasad w pary, takiej samej jak obowiazująca podczas replikacji lub transkrypcji. Dokładna i szybka translacja mRNA na białko wymaga jednak potężnego aparatu

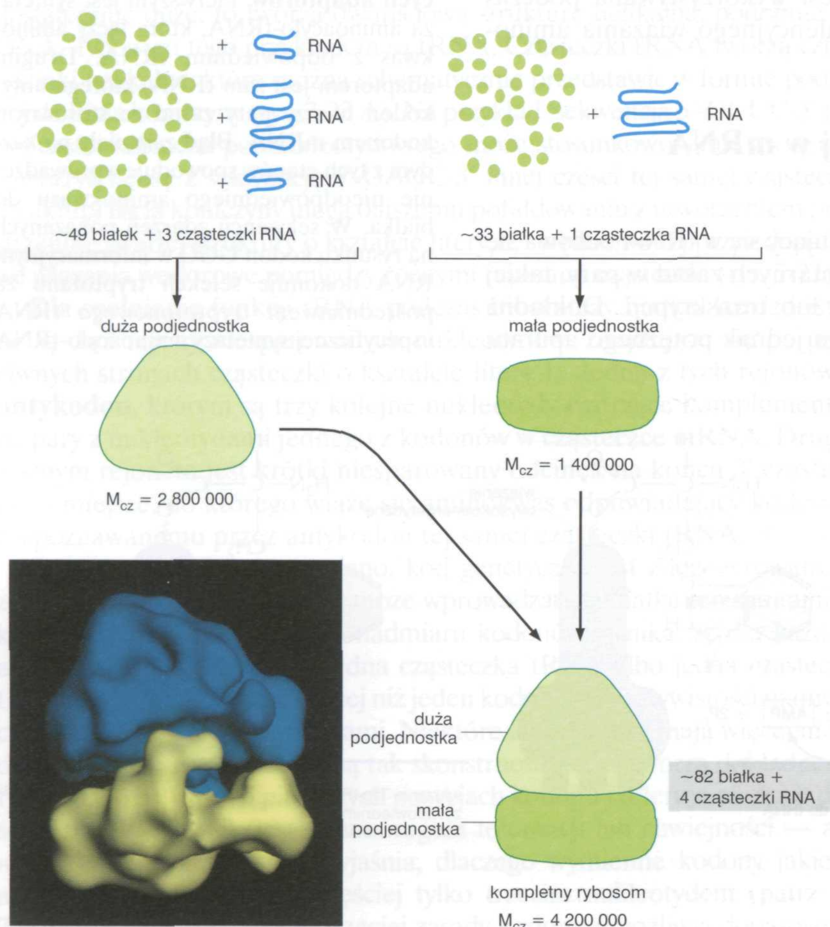
Rys. 7-23. Kod genetyczny ulega translacji z udziałem dwóch współdziałających adaptorów. Pierwszym jest syntetaza aminoacylo-tRNA, która łączy aminokwas z odpowiednim tRNA. Drugim adaptorem jest sam tRNA, którego antykodon tworzy pary zasad ze stosownym kodonem mRNA. Błąd zaistniały na każdym z tych etapów spowoduje wprowadzenie nieodpowiedniego aminokwasu do białka. W sekwencji zdarzeń pokazanych na rysunku kodon UGG w informacyjnym RNA dokonuje selekcji tryptofanu za pośrednictwem tryptofonowego tRNA i specyficznej syntetazy aminoacylo-tRNA



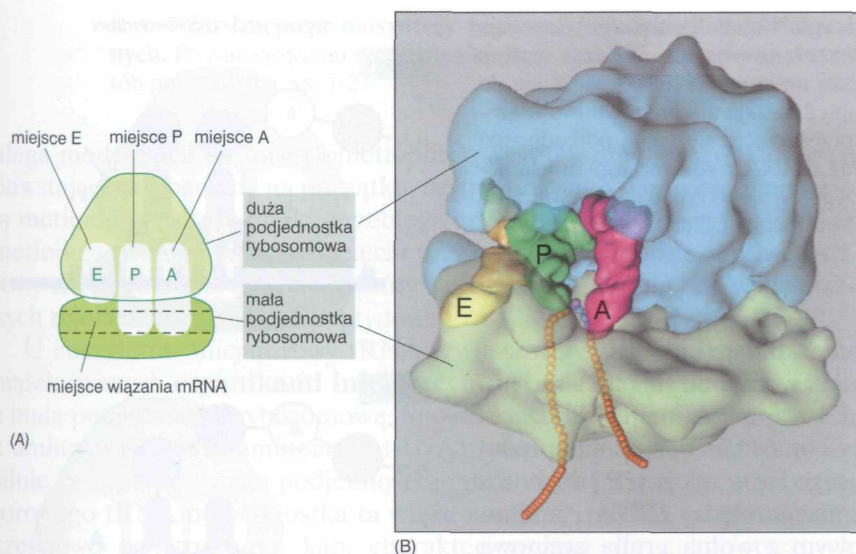


Rys. 7-24. Rybosomy w cytoplazmie komórki eukariotycznej. Mikrografia elektronowa pokazuje cienki wycinek niewielkiego obszaru cytoplazmy. Rybosomy są tu widoczne w postaci ciemnych plamek (*czerwone strzałki*). Niektóre z nich występują w stanie wolnym w cytozolu, inne są związane z błonami retikulum endoplazmatycznego. (Dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)

molekularnego, który przemieszczając się wzdłuż mRNA wyłapuje komplementarne cząsteczki tRNA, przytrzymuje je w odpowiednim miejscu i łączy noszone przez nie aminokwasy w łańcuch polipeptydowy. Aparatem do wytwarzania białek jest **rybosom** — duży kompleks złożony z 50 różnych białek (białek rybosomowych) i kilku cząsteczek RNA, **zwanych rybosomowymi RNA (rRNA)**. Typowa komórka zawiera w cytoplazmie miliony rybosomów (rys. 7-24). U eukariotów podjednostki rybosomowe powstają w jądrze przez asocjację świeżo zsyntetyzowanego rRNA



Rys. 7-25. Składniki eukariotycznego rybosomu. Całkowitej trójwymiarowej struktury rybosomu jeszcze nie znamy, ale model rybosomu prokariotycznego o niskiej rozdzielczości opracowano na podstawie mikroskopii elektronowej. Model pokazano w lewej dolnej części rysunku; duża podjednostka — kolor *niebieski*, mała — *żółty*. Rybosomy prokariotyczne i eukariotyczne mają podobne struktury o innej masie cząsteczkowej (M_{cz}). (Dzięki uprzejmości: Joachim Frank)



Rys. 7-26. Miejsca wiązania RNA na rybosomie. Każdy rybosom ma miejsce wiązania mRNA oraz trzy miejsca wiązania tRNA, oznaczone jako miejsca A, P oraz E (skróty od: A — aminoacylo-tRNA, P — peptydylo-tRNA, E ang. exit — wyjście). (A) W takiej bardzo schematycznej formie będą przedstawiane rybosomy na następnych rysunkach. (B) Model rybosomu prokariotycznego ilustrujący ułożenie mRNA (*pomarańczowa taśma*) oraz cząsteczek tRNA w miejscu A rybosomu (kolor *różowy*), miejscu P (*zielony*) i miejscu E (*żółty*). Na modelu tym duża podjednostka jest jasnoniebieska, mała — *jasnozielona*. Chociaż na modelu pokazano wszystkie trzy miejsca zajmowane przez tRNA, podczas trwającej syntezy białka tylko dwa z nich mogą jednocześnie zawierać tRNA. (patrz rys. 7-27). (B dzięki uprzejmości: Joachim Frank, Yanhong Li, Rajendra Agarwal)

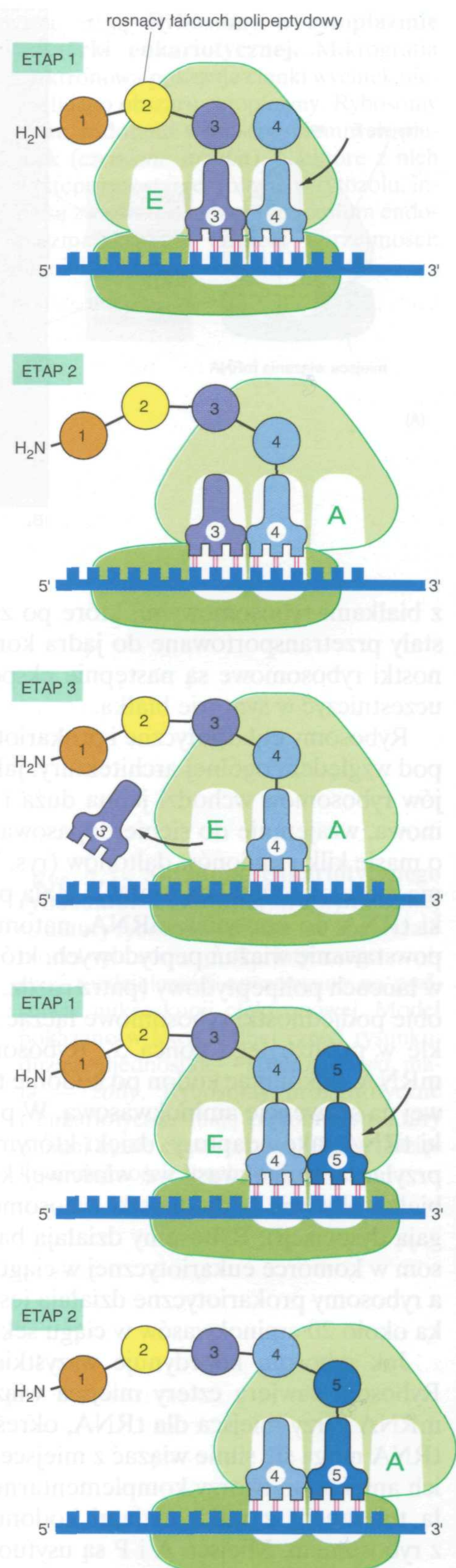
z białkami rybosomowymi, które po zsyntetyzowaniu w cytoplazmie zostały przetransportowane do jądra komórkowego. Poszczególne podjednostki rybosomowe są następnie eksportowane do cytoplazmy, aby tam uczestniczyć w syntezie białka.

Rybosomy eukariotyczne i prokariotyczne są bardzo podobne zarówno pod względem ogólnej architektury, jak i funkcji. W skład obydwu rodzajów rybosomów wchodzi jedna duża i jedna mała podjednostka rybosomowa, wzajemnie do siebie dopasowane i tworzące kompletny rybosom o masie kilku milionów daltonów (rys. 7-25), (białko przeciętnej wielkości ma masę ok. 40 000 daltonów). Mała podjednostka dopasowuje cząsteczki tRNA do kodonów mRNA, natomiast duża podjednostka katalizuje powstawanie wiązań peptydowych, które łączą poszczególne aminokwasy w łańcuch polipeptydowy (patrz rozdz. 2). Żeby rozpocząć syntezę białka, obie podjednostki rybosomowe łącząc się ze sobą obejmują mRNA, zwykle w pobliżu jego końca 5′. Rybosom przesuwa się następnie wzdłuż mRNA, dokonując kodon po kodonie tłumaczenia sekwencji nukleotydowej na sekwencję aminokwasową. W procesie tym wykorzystuje cząsteczki tRNA jako adaptory, dzięki którym do końca rosnącego polipeptydu przyłącza aminokwasy we właściwej kolejności. Po zakończeniu syntezy białka obydwie podjednostki rybosomowe ponownie rozłączają się (ulegają dysocjacji). Rybosomy działają bardzo skutecznie: pojedynczy rybosom w komórce eukariotycznej w ciągu sekundy przyłącza 2 aminokwasy, a rybosomy prokariotyczne działają jeszcze szybciej, wbudowując do białka około 20 aminokwasów w ciągu sekundy.

Jak rybosom koordynuje wszystkie ruchy niezbędne do translacji? Rybosom zawiera cztery miejsca wiązania cząsteczek RNA: jedno dla mRNA i trzy miejsca dla tRNA, określane jako A, P oraz E. Cząsteczki tRNA mogą się silnie wiązać z miejscem A i miejscem P tylko wtedy, gdy ich antykodon tworzy komplementarne pary (dozwolone zgodnie z regułą tolerancji) z nukleotydami kodonu w cząsteczce mRNA zwiazanej z rybosomem. Miejsca A i P są usytuowane na tyle blisko siebie, że cząsteczki tRNA związane przez rybosom w tych miejscach, muszą tworzyć pary zasad z kodonami, które w mRNA sąsiadują ze sobą (rys. 7-26).

Po zainicjowaniu syntezy białka, każdy nowy aminokwas jest dołączany w cyklu reakcji elongacyjnych. Przyglądnijmy się tym reakcjom w momencie, gdy już kilka aminokwasów jest połączonych, a rosnący polipeptyd jest związany z tRNA znajdującym się w miejscu P na rybosomie (rys. 7-27,

Rys. 2-27. Translacja cząsteczki mRNA. Pokazana tu sekwencja trzech kolejnych etapów jest wielokrotnie powtarzana podczas syntezy białka. W pierwszym etapie cząsteczka aminoacylo-tRNA wiąże się do miejsca A na rybosomie, podczas etapu 2 zostaje utworzone nowe wiązanie peptydowe, a etap 3 polega na przesunięciu się małej podjednostki o odcinek trzech nukleotydów wzdłuż mRNA z równoczesnym usunięciem wolnego tRNA z miejsca E. Przygotowuje to rybosom do związania następnego aminoacylo-tRNA i powtórzenia cyklu. Jak zaznaczono, mRNA ulega translacji w kierunku 5'→3', a synteza polipeptydu rozpoczyna się od końca aminowego



etap 1). Z pustym miejscem A na rybosomie wiąże się teraz tRNA noszący następny aminokwas. Jest to możliwe dzięki tworzeniu się par zasad pomiędzy kodonem eksponowanym w miejscu A a antykodonem wchodzącego tRNA. Następnie (etap 2) karboksylowy koniec łańcucha polipeptydowego zostaje odłączony od tRNA znajdującego się w miejscu P (dochodzi do zerwania wysokoenergetycznego wiązania pomiędzy tRNA i aminokwasem) i połączony wiązaniem peptydowym z wolną grupą aminową reszty aminokwasu związanego z tRNA znajdującym się w miejscu A. Ta podstawowa dla syntezy białka reakcja jest katalizowana przez *peptydydylotransferazę*, będącą integralną częścią rybosomu. Katalityczną część rybosomu w tym przypadku stanowią nie białka, ale raczej jeden z rRNA zawartych w dużej podjednostce rybosomowej. Jak pokazano na rysunku, reakcja przeniesienia grupy peptydylowej jest sprzężona (jak się przypuszcza) z przesunięciem się małej podjednostki, wiążącej mRNA, względem dużej podjednostki rybosomowej. Przesunięcie to powoduje przemieszczenie się wolnego tRNA z miejsca P do miejsca E, a peptydylo-tRNA z miejsca A do miejsca P. Podczas trzeciego etapu mała podjednostka przesuwa się dokładnie o trzy nukleotydy (jeden kodon) wzdłuż mRNA, wracając do wyjściowego położenia w stosunku do dużej podjednostki rybosomowej, a tRNA zajmujący miejsce E opuszcza rybosom. Cykl takich trzech etapów powtarza się każdorazowo podczas przyłączania kolejnego aminokwasu do rosnącego polipeptydu, którego łańcuch jest wydłużany od końca aminowego do karboksylowego aż do chwili, gdy na mRNA pojawi się kodon stop.

Kodony mRNA sygnalizują, gdzie zacząć i gdzie skończyć syntezę białka

Miejsce na mRNA, od którego rozpoczyna się synteza białka, ma bardzo istotne znaczenie, ponieważ ustala ono ramkę odczytu informacji w całym mRNA. Błąd rozpoznania początku odczytu o jeden nukleotyd w prawo lub w lewo powodowałby błędy odczytu wszystkich kodonów, tak że powstawałoby niefunkcjonalne białko z fałszywą sekwencją aminokwasów (patrz rys. 7-21). Etap inicjacji jest bardzo ważny także i dlatego, że stanowi ostatni punkt, w którym komórka może decydować, czy jakiś mRNA powinien ulec translacji, czy nie. Szybkość inicjacji decyduje więc o szybkości, z jaką zachodzi synteza konkretnego białka.

Translacja zaczyna się od kodonu inicjującego AUG, rozpoznawanego przez specjalny tRNA, niezbędny do inicjacji translacji. Ten **inicjatorowy tRNA** wiąże się z metioniną (w bakteriach metionina związana z tRNA

Pytanie 7-6. Do syntezy RNA, wykorzystanego następnie do translacji, użyto jako matrycy łańcucha DNA o następującej sekwencji: 5'-T-T-A-A-C-G-G-C-T-T-T-T-T-T-C-3'. Jakie byłyby aminokwasy C- i N-końcowe w uzyskanym polipeptydzie? Przyjmijmy, że translacja tego RNA nie wymaga kodonu inicjującego.

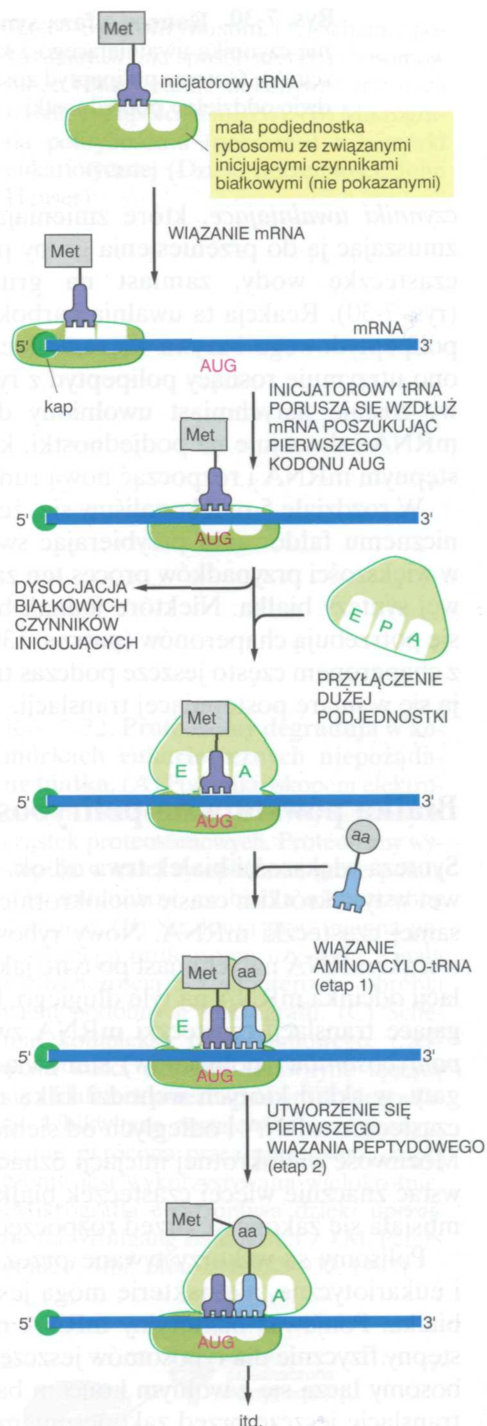
Rys. 7-28. Inicjacja biosyntezy białka w komórkach eukariotycznych. Po zainicjowaniu syntezy białka, jego wydłużanie przebiega w sposób pokazany na rys. 7-27

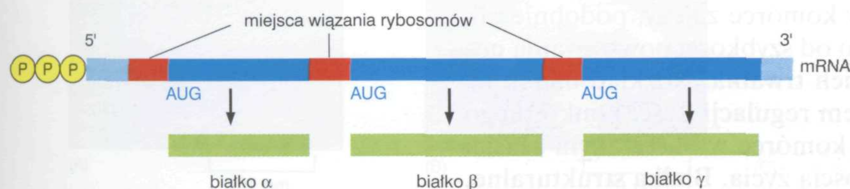
ulega modyfikacji do formylometioniny), wskutek czego wszystkie nowo powstające polipeptydy na początku, czyli w pozycji N-końcowej, zawierają metioninę (synteza białka przebiega od końca N do końca C). Zwykle metionina ta ulega później odcięciu przez specyficzną proteazę. Inicjatorowy tRNA różni się od tRNA, który wprowadza metioninę do wewnętrznych rejonów łańcucha polipeptydowego.

U eukariotów inicjatorowy tRNA (związany z metioniną) z udziałem białek zwanych **czynnikami inicjującymi** (rys. 7-28) najpierw wiąże się z małą podjednostką rybosomową. Spośród wszystkich tRNA związanych z aminokwasami (tj. aminoacylo-tRNA) tylko inicjatorowy tRNA może silnie związać się z małą podjednostką rybosomową. Po związaniu inicjatorowego tRNA podjednostka ta wiąże koniec 5′ mRNA rozpoznawany częściowo po strukturze kap, charakterystycznej dla eukariotycznych mRNA (patrz rys. 7-12 B). Mała podjednostka rybosomowa przesuwa się wzdłuż mRNA (w kierunku 5′→3′), poszukując pierwszego kodonu AUG. Po napotkaniu go, od małej podjednostki odłącza się kilka białkowych czynników inicjujących, przygotowując w ten sposób miejsce do związania dużej podjednostki i utworzenia kompletnego rybosomu. Ponieważ inicjatorowy tRNA jest związany w miejscu P rybosomu, do wolnego miejsca A może przyłączyć się aminoacylo-tRNA, którego antykodon jest komplementarny do kodonu następnego za kodonem inicjującym (rys. 7-28). Tworzy się pierwsze wiązanie peptydowe i rozpoczyna proces elongacji (wydłużania) polipeptydu.

Mechanizm selekcji kodonu startowego u bakterii jest inny. Bakteryjny mRNA na końcu 5′ nie zawiera struktury kap, która mogłaby informować rybosom, od jakiego miejsca ma on rozpocząć poszukiwania sygnału startu translacji. Zawiera natomiast sekwencję o długości do sześciu nukleotydów, za pomocą której bakteryjny mRNA wiąże się z rybosomem. Sekwencje takie są ulokowane w odległości kilku nukleotydów przed kodonem AUG, od którego rozpoczyna się translacja. Odwrotnie niż w przypadku rybosomów eukariotycznych, rybosomy prokariotyczne łatwo mogą wiązać się bezpośrednio z kodonami start leżącymi wewnątrz mRNA, pod warunkiem, że o kilka nukleotydów przed takim kodonem znajduje się sekwencja wiążąca rybosom. W rezultacie tego prokariotyczne mRNA często są policistronowe, to znaczy, że kodują kilka różnych białek, z których każde jest syntetyzowane na tej samej cząsteczce mRNA (rys. 7-29). Eukariotyczny mRNA natomiast zwykle zawiera informacje o syntezie tylko jednego białka.

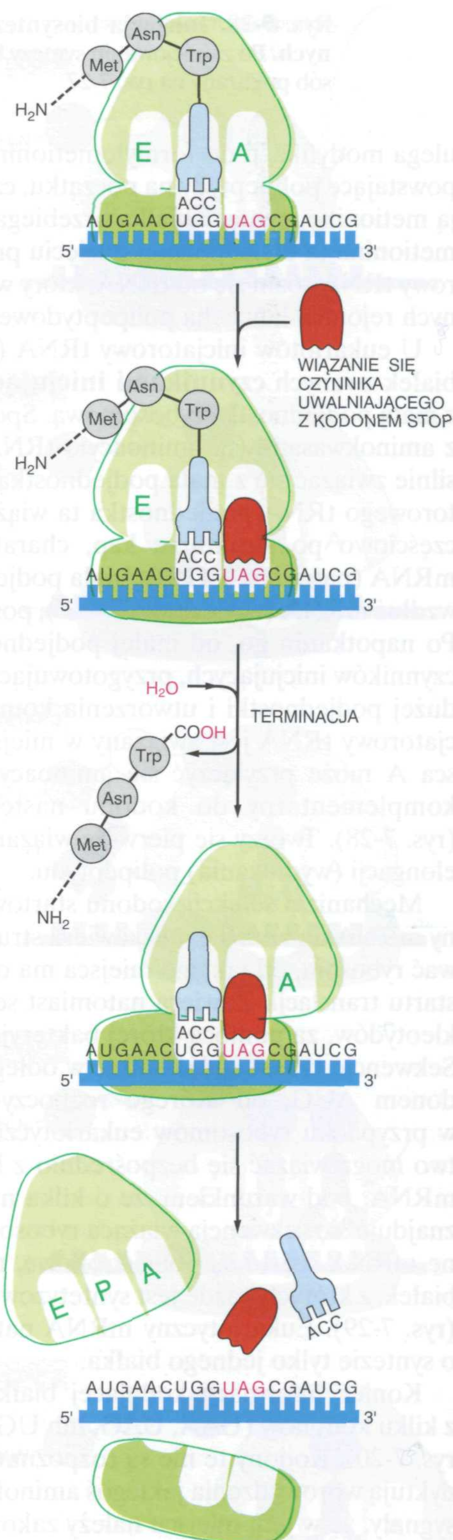
Koniec informacji kodującej białko jest sygnalizowany przez jeden z kilku kodonów (UAA, UAG, lub UGA), zwanych kodonami stop (patrz rys. 7-20). Kodony te nie są rozpoznawane przez jakikolwiek tRNA i nie dyktują wprowadzenia jakiegoś aminokwasu, ale stanowią dla rybosomów sygnały, że w tym miejscu należy zakończyć translację. Z kodonami stop, które osiągnęły miejsce A na rybosomie, wiążą się białka, określane jako





Rys. 7-29. Struktura typowej prokariotycznej cząsteczki mRNA. Inaczej niż rybosomy eukariotyczne rozpoznające kap na końcu 5′ mRNA, rybosomy prokariotyczne inicjują syntezę białka po rozpoznaniu miejsc wiązania rybosomów, które w prokariotycznym mRNA występują w początkowych odcinkach transkryptu, a także wewnątrz jego sekwencji. Umożliwia to prokariotom syntezę więcej niż jednego typu białka na podstawie informacji zawartej w jednym (policistronowym) mRNA

Rys. 7-30. Końcowa faza syntezy białka. Translację kończy związanie czynnika uwalniającego z kodonem stop (znajdującym się w miejscu A). Gotowy polipeptyd zostaje uwolniony, a rybosom dysocjuje na dwie oddzielne podjednostki



czynniki uwalniające, które zmieniają aktywność peptydylotransferazy, zmuszając ją do przeniesienia grupy peptydylowej z peptydylo-tRNA na cząsteczkę wody, zamiast na grupę aminową aminoacylo-tRNA (rys. 7-30). Reakcja ta uwalnia karboksylowy koniec rosnącego łańcucha polipeptydowego i zrywa wiązanie łączące go z tRNA, a ponieważ tylko ono utrzymuje rosnący polipeptyd z rybosomem, gotowy łańcuch białkowy zostaje natychmiast uwolniony do cytoplazmy. Rybosom uwalnia mRNA i dysocjuje na podjednostki, które mogą teraz połączyć się z następnym mRNA i rozpocząć nową rundę syntezy białka.

W rozdziale 5 przekonaliśmy się, że każde białko może ulegać spontanicznemu fałdowaniu przybierając swoisty kształt przestrzenny oraz że w większości przypadków proces ten zachodzi jeszcze podczas rybosomowej syntezy białka. Niektóre jednak białka do poprawnego sfałdowania się potrzebują chaperonów (patrz s. 139). Białka takie wchodzą w kontakt z chaperonem często jeszcze podczas trwającej syntezy i poprawnie fałdują się w miarę postępującej translacji.

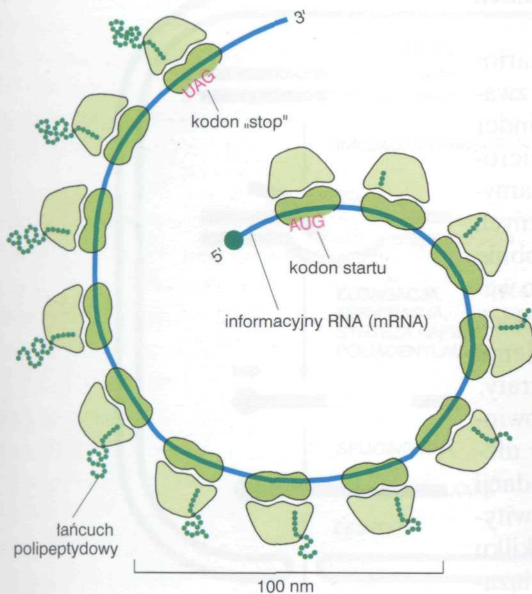
Białka powstają na polirybosomach

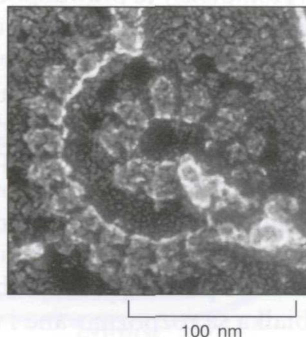
Synteza większości białek trwa od ok. 20 sekund do kilku minut. Ale nawet w tym krótkim czasie wielokrotnie dochodzi do inicjacji translacji tej samej cząsteczki mRNA. Nowy rybosom „rzuca się" na 5′ koniec cząsteczki mRNA natychmiast po tym, jak poprzedni rybosom dokona translacji odcinka mRNA na tyle długiego, by zrobić miejsce dla nowego. Ulegające translacji cząsteczki mRNA zwykle występują dlatego w postaci *polirybosomów* (polisomów) stanowiących duże cytoplazmatyczne agregaty, w skład których wchodzi kilka rybosomów działających na jednej cząsteczce mRNA i odległych od siebie o ok. 80 nukleotydów (rys. 7-31). Możliwość wielokrotnej inicjacji oznacza, że w jednostce czasu może powstać znacznie więcej cząsteczek białka, niż gdyby synteza każdej z nich musiała się zakończyć przed rozpoczęciem następnej.

Polisomy są wykorzystywane przez komórki zarówno bakteryjne, jak i eukariotyczne, ale bakterie mogą jeszcze bardziej przyspieszyć syntezę białka. Ponieważ bakteryjny mRNA nie wymaga dojrzewania i jest dostępny fizycznie dla rybosomów jeszcze w czasie trwającej transkrypcji, rybosomy łączą się z wolnym końcem bakteryjnego mRNA i rozpoczynają translację jeszcze przed zakończeniem się transkrypcji, podążając w niewielkiej odległości za polimerazą RNA.

Kontrolowany rozkład białek umożliwia komórkom regulację poziomu każdego białka

Liczba cząsteczek określonego białka w komórce zależy, podobnie jak w przypadku populacji ludzkiej, nie tylko od szybkości powstawania nowych indywiduów, lecz także od czasu ich trwania. Rozkład białek na składowe aminokwasy jest więc sposobem regulacji ilości konkretnego białka, która powinna znajdować się w komórce w określonym czasie. Białka różnią się bardzo znacznie długością życia. Białka strukturalne,

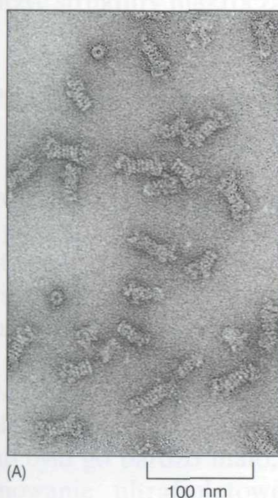


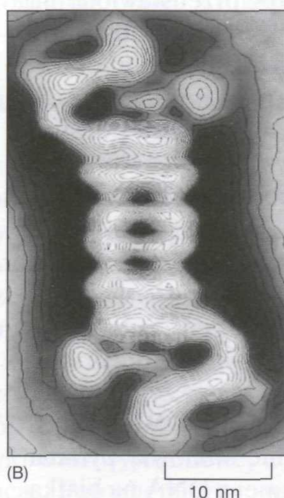


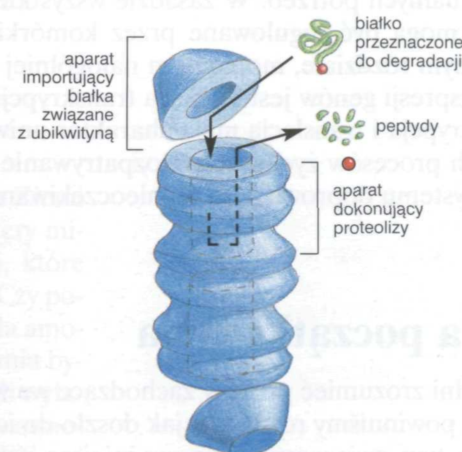
Rys. 7-31. Polirybosom. (A) Schemat pokazujący, w jaki sposób szereg rybosomów może równocześnie dokonywać translacji tej samej cząsteczki mRNA. (B) Mikrografia polirybosomu (polisomu) z komórki eukariotycznej (Dzięki uprzejmości: John Heuser)

które stają się częścią stosunkowo trwałych tkanek, takich jak kości lub mięśnie, muszą trwać miesiącami lub nawet latami, podczas gdy inne białka, takie jak enzymy metaboliczne lub regulujące cykl wzrostu komórek, mitozy i podziałów (patrz rozdz. 18) istnieją zaledwie przez kilka dni, godzin lub nawet sekund. Jak komórka kontroluje czas życia białek?

Komórki mają wyspecjalizowane szlaki rozkładu białek do aminokwasów (proces ten nazywamy *proteolizą*). Enzymy degradujące białka — najpierw do krótkich peptydów, a w końcu do aminokwasów — są zbiorowo określane jako **proteazy**. Działanie proteaz polega na rozcinaniu (hydrolizie) wiązań peptydowych pomiędzy aminokwasami (patrz panel 2-5, s. 62–63). Jedną z funkcji szlaku proteolizy białka jest szybka degradacja tych białek, których okres życia musi być krótki. Druga polega na rozpoznaniu i eliminacji białek uszkodzonych lub źle sfałdowanych. Omawiane tutaj procesy rozkładu białek zachodzą w cytozolu, chociaż ważne szlaki







Rys. 7-32. Proteosomy degradują w komórkach eukariotycznych niepożądane białka. (A) Pod mikroskopem elektronowym widać dużą ilość wybarwionych cząstek proteosomowych. Proteosomy występują w całej cytoplazmie, gdzie pełnią rolę śmietników na białka niepotrzebne komórce. (B) Struktura przestrzenna pojedynczego proteosomu uzyskana z małą rozdzielczością z komputerowej obróbki wielu podobnych mikrografii. (C) Schemat kompleksu proteosomowego. *Czerwona* kulka oznacza ubikwitynę łączącą się z białkiem przeznaczonym do degradacji. Ubikwityna zostaje w nienaruszonym stanie zwrócona przez proteosom, dzięki czemu jest wykorzystywana wielokrotnie. (Mikrografia elektronowa dzięki uprzejmości: Wolfgang Baumeister z J.M. Peters et al., *J. Mol. Biol.* 234: 932–937, 1993)

rozkładu białek działają też w innych przedziałach komórkowych, takich jak lizosomy (rozdz. 14).

Większość białek ulegających degradacji w cytozolu komórek eukariotycznych jest rozkładana przez kompleksy enzymów proteolitycznych, zwane **proteosomami**. W centralnej części proteosomu znajduje się cylinder złożony z proteaz, których miejsca aktywne, jak się przypuszcza, są skierowane do wewnętrznej strony cylindra. Każdy z końców cylindra jest zamykany dużym kompleksem białkowym, złożonym z co najmniej 10 różnych typów podjednostek białkowych (rys. 7-32). Kompleksy te prawdopodobnie wiążą białka przeznaczone do degradacji i następnie wprowadzają je do wewnętrznej części cylindra, w której proteazy degradują białka do krótkich peptydów uwalnianych następnie poza obręb proteosomu. Dzięki takiemu ułożeniu proteazy są zaopatrywane w dobrze wyselekcjonowane substraty.

Jak proteosomy dokonują w komórce selekcji tych białek, które powinny wejść do cylindra i ulec tam degradacji? Działaniu proteosomów ulegają przede wszystkim te białka, które zostały naznaczone do degradacji poprzez kowalencyjne przyłączenie małego białka nazywanego ubikwityną. Specjalne enzymy znakują wybrane białka za pomocą jednej lub kilku cząsteczek *ubikwityny*, a ubikwitynowane białka są rozpoznawane i wiązane przez proteosomy, prawdopodobnie przez jedno z białek tworzących kompleks zamykający cylinder proteaz.

Krótko żyjące białka często wyróżniają się krótkimi sekwencjami aminokwasów, które naznaczają te białka jako cząsteczki przeznaczone do ubikwitynacji i ostatecznie degradacji przez proteosomy. System proteolityczny zależny od ubkwityny rozpoznaje także białka zdenaturowane lub źle sfałdowane, albo zawierające utlenione lub w inny sposób zniekształcone aminokwasy. Enzymy, które dołączają ubikwitynę do białek, prawdopodobnie rozpoznają je na podstawie sygnałów eksponowanych przez te białka w wyniku złego sfałdowania się lub chemicznych uszkodzeń. Na przykład mogą rozpoznawać sekwencje aminokwasów lub motywy konformacyjne, które normalnie powinny znajdować się wewnątrz białek.

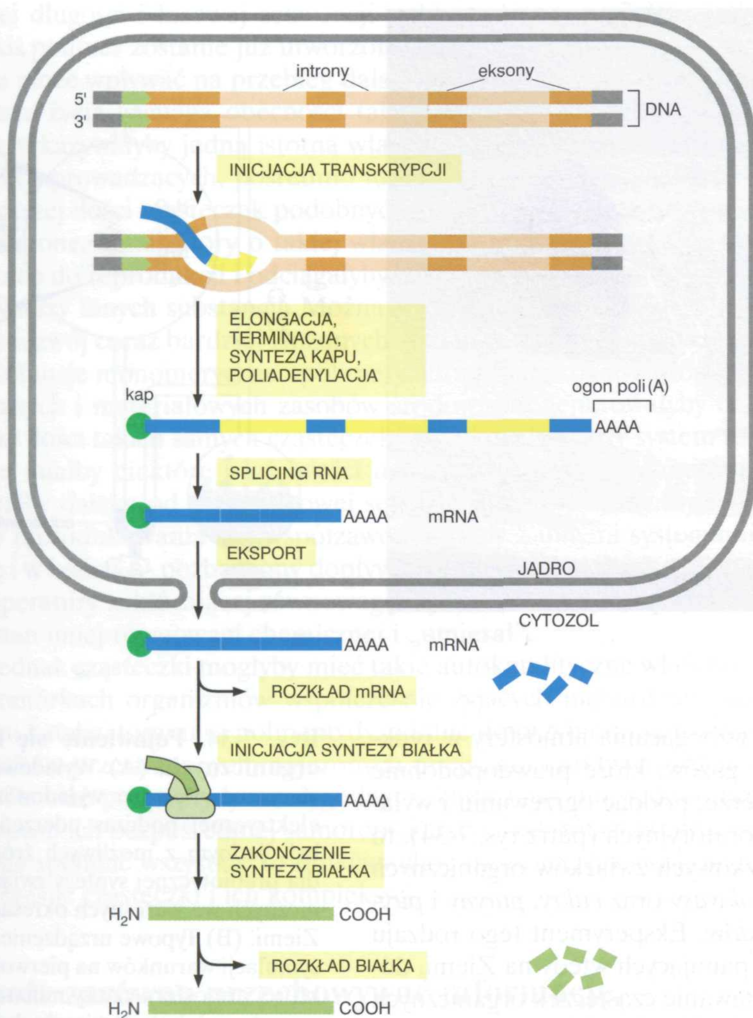
Droga od DNA do białek obejmuje wiele etapów

Dotychczas przekonaliśmy się, że do wyprodukowania białka na podstawie informacji zawartej w genie niezbędne jest wiele typów różnych reakcji chemicznych (rys. 7-33). Końcowa zawartość białka w komórce zależy od wydajności, z jaką zachodzą poszczególne jednostkowe reakcje lub etapy syntezy białka. W następnym rozdziale przekonamy się, że komórki są zdolne do zmiany poziomu większości swoich białek i dostosowania go do aktualnych potrzeb. W zasadzie wszystkie etapy przedstawione na rys. 7-33 mogą być regulowane przez komórki. Jak jednak zobaczymy w następnym rozdziale, momentem najogólniej wykorzystywanym do regulacji ekspresji genów jest inicjacja transkrypcji.

Transkrypcja i translacja mają charakter uniwersalny i leżą u podstaw wszystkich procesów życiowych. Rozpatrywanie początków tego uniwersalnego systemu doprowadziło do nieoczekiwanie ciekawych wniosków.

RNA a początki życia

Aby w pełni zrozumieć zachodzące we współcześnie żyjących komórkach procesy, powinniśmy rozważyć, jak doszło do ich powstania. Wśród problemów z tym związanych najpoważniejsze wyzwanie stanowią pytania o dziedziczność informacji, współcześnie przekazywanej z DNA na białka



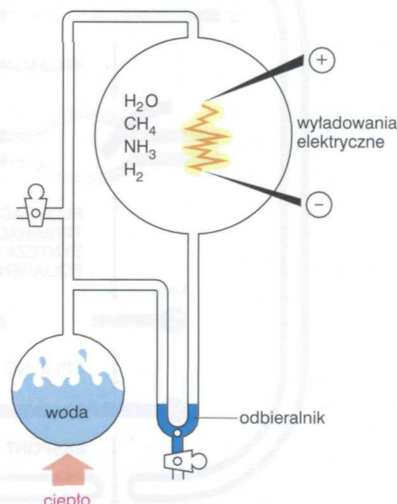
Rys. 7-33. Powstawanie białka w komórce eukariotycznej. Końcowy poziom każdego białka w komórce eukariotycznej zależy od wydajności każdego z etapów przedstawionych na rysunku. Etapy te wprawdzie przedstawiono tak, jakby następowały kolejno jeden po drugim, ale w komórce często zachodzą równocześnie. Na przykład splicing jakiegoś RNA często zaczyna się jeszcze przed zakończeniem transkrypcji

za pośrednictwem RNA z udziałem niezwykle skomplikowanego aparatu molekularnego. Jak doszło do powstania tego aparatu? Argumenty ewolucyjne wskazują, że sekwencja zdarzeń, które doprowadziły do utworzenia się pierwszych żywych komórek, *rozpoczęła* się od RNA i sugerują, że cząsteczki DNA i białek pojawiły się później. RNA mógł sam działać jako prącząsteczka życia, gdyż może zarówno być nośnikiem informacji (jak DNA) czy katalizatorem reakcji chemicznych (jak białka enzymatyczne), jak i tworzyć struktury makrocząsteczkowe (jak białka strukturalne).

W warunkach prebiotycznych mogły powstawać proste cząsteczki biologiczne

Proste węglowe cząsteczki organiczne prawdopodobnie powstały na Ziemi podczas pierwszego miliarda lat jej egzystencji, to znaczy ponad cztery miliardy lat temu (rys. 7-34). Warunki istniejące wówczas na Ziemi, które umożliwiłyby ich powstanie, wciąż jeszcze są przedmiotem dyskusji. Czy powierzchnia planety była początkowo płynna? Czy atmosfera zawierała amoniak lub metan? Istnieje jednak ogólna zgodność poglądów, że Ziemia była w tym czasie miejscem gwałtownych erupcji wulkanicznych, silnych wyładowań elektrycznych i potężnych opadów. Nie było w ogóle tlenu w atmosferze lub było go bardzo mało, nie było warstwy ozonowej absorbującej promieniowanie ultrafioletowe Słońca. Fotochemiczny wpływ tego


(A)

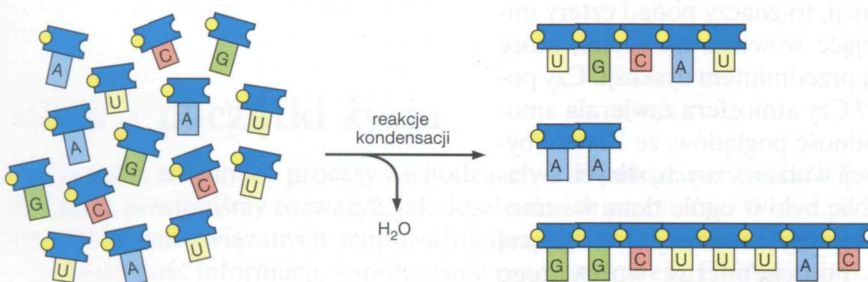


(B)

Rys. 7-34. **Pojawienie się cząsteczek organicznych.** (A) Wyładowanie atmosferyczne. Potężne wyładowania energii elektrycznej podczas uderzeń piorunów były jednym z możliwych źródeł energii dla prebiotycznej syntezy związków organicznych we wczesnych okresach rozwoju Ziemi. (B) Typowe urządzenie służące do symulacji warunków na pierwotnej Ziemi, której atmosfera cztery miliardy lat temu prawdopodobnie zawierała dużo metanu, amoniaku i wodoru oraz pary wodnej. W zamkniętym aparacie zawierającym te związki woda jest utrzymywana w stanie wrzenia, a mieszaninę lotnych składników poddaje się wyładowaniom elektrycznym. Związki organiczne zbierają się w odbieralniku o kształcie litery U. (A dzięki uprzejmości: W. Faidley, Oxford Scientific Films)

promieniowania mógł przyczyniać się do wzbogacania atmosfery w reaktywne cząsteczki. Jeśli dzisiaj mieszaninę gazów, które prawdopodobnie znajdowały się w tamtym czasie w atmosferze, poddać ogrzewaniu i wyładowaniom elektrycznym w warunkach laboratoryjnych (patrz rys. 7-34), to otrzymuje się większość klas małocząsteczkowych związków organicznych występujących w komórkach, w tym *aminokwasy* oraz *cukry*, *puryny* i *pirymidyny*, potrzebne do powstania *nukleotydów*. Eksperyment tego rodzaju nie może dokładnie odtworzyć warunków panujących wtedy na Ziemi, dostarcza jednak jasnych informacji, że powstawanie cząsteczek organicznych jest nadspodziewanie łatwe. A rozwijająca się Ziemia miała ogromną przewagę nad jakimkolwiek eksperymentem obecnie wykonywanym przez człowieka: była ogromna, mogła generować bardzo szerokie spektrum warunków, a co najważniejsze — miała czas liczony setkami milionów lat. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że w tych warunkach, w jakimś czasie i w jakimś miejscu doszło do powstania prostych związków organicznych w dużym stężeniu.

Proste związki organiczne, takie jak nukleotydy, mogły łączyć się tworząc przypadkowe polimery. Pomimo nadmiaru wody, który faworyzowałby raczej reakcje hydrolizy niż kondensacji (reakcje prowadzące do połączenia się nukleotydów, patrz rozdz. 2 i 3), polinukleotydy mogły tworzyć się w suchych osadach pozostających po wyparowaniu wody z płytkich zbiorników. Jedna z aktualnych hipotez zakłada, że w tworzeniu się takich polimerów mogły pomagać mineralne katalizatory. W warunkach laboratoryjnych naśladujących tego rodzaju okoliczności, powstają polimery



Rys. 7-35. **Powstawanie polinukleotydów.** Nukleotydy mogą ulegać spontanicznej polimeryzacji przez reakcje kondensacji (w czasie których wydziela się woda) (patrz rys. 2-26 i 3-33). Produktem jest mieszanina polinukleotydów o przypadkowej długości i sekwencji nukleotydów. Tu przedstawiono polimeryzację czterech rodzajów nukleotydów (oznaczonych literami A, U, G i C) typowo występujących w RNA

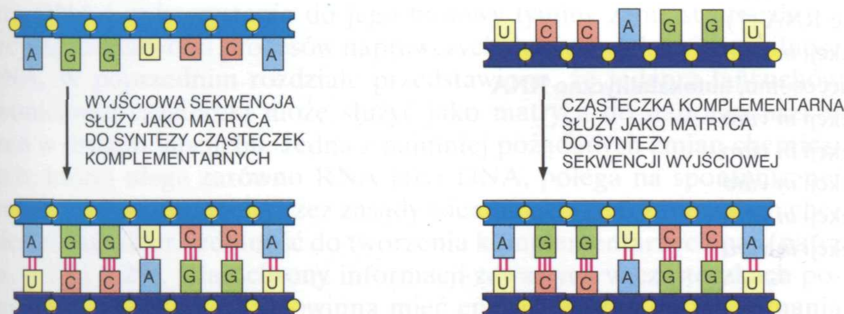
o zmiennej długości i losowej sekwencji nukleotydów (rys. 7-35). Jeśli jednak jakiś polimer zostanie już utworzony, to działając jako katalizator w zasadzie może wpływać na przebieg dalszych reakcji chemicznych.

Powstanie życia wymaga obecności takich cząsteczek, które chociaż częściowo wykazywałyby jedną istotną właściwość: zdolność do katalizowania reakcji prowadzących, pośrednio lub bezpośrednio, do wytworzenia się większej ilości cząsteczek podobnych do wyjściowej. Raz przypadkowo utworzone, katalizatory o takiej właściwości samopromowania się byłyby zdolne do reprodukcji i odciągałyby substraty od konkurencyjnych szlaków syntezy innych substancji. Można w ten sposób wyobrazić sobie stopniowy rozwój coraz bardziej złożonych systemów obejmujących organiczne substancje monomeryczne i polimery, które korzystając z prostych energetycznych i materiałowych zasobów środowiska, generowałyby coraz większe ilości takich samych cząsteczek. **Autokatalityczny** system tego rodzaju miałby niektóre właściwości uznane za cechy żywej materii: dysponowałby daleką od przypadkowej selekcją substratów; miałby tendencję do reprodukowania się, współzawodniczyłby z innymi systemami o surowce i w końcu — pozbawiony dopływu surowców lub poddany działaniu temperatury zakłócającej równowagę szybkości reakcji — przechodziłby w stan innej równowagi chemicznej i „umierał".

Jakie jednak cząsteczki mogłyby mieć takie autokatalityczne właściwości? W komórkach organizmów współcześnie żyjących najbardziej uniwersalnymi katalizatorami są polipeptydy, zdolne do przybierania rozmaitych kształtów przestrzennych, najeżonych miejscami reaktywnymi chemicznie. Chociaż polipeptydy są wygodnymi katalizatorami, jednak nie istnieje sposób ich bezpośredniej samoreprodukcji. Natomiast polinukleotydy mogą spełniać wszystkie te funkcje, choć może nie tak doskonale jak współczesne cząsteczki i ich kompleksy.

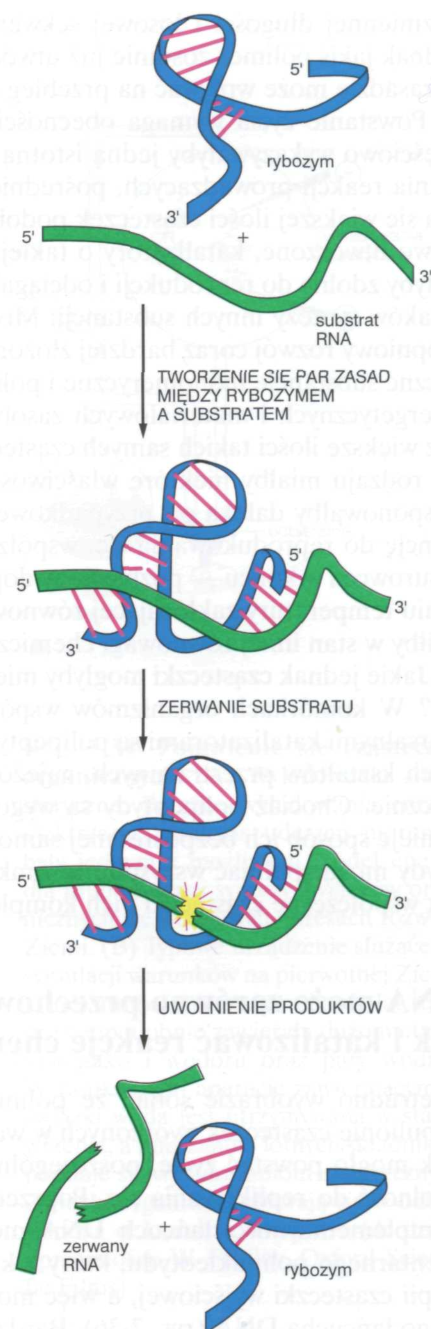
RNA może zarówno przechowywać informację, jak i katalizować reakcje chemiczne

Nietrudno wyobrazić sobie, że polinukleotydy stale mogły powstawać w bulionie cząsteczek tworzonych w warunkach prebiotycznych. Aby jednak mogło powstać życie, poszczególne polinukleotydy musiały uzyskać zdolność do replikowania się. Poprzednio widzieliśmy, że dzięki regule komplementarności łańcuch DNA może dyktować sekwencję komplementarnego polinukleotydu, który z kolei może być matrycą do syntezy kopii cząsteczki wyjściowej, a więc może zachodzić replikacja początkowego łańcucha DNA (rys. 7-36). Bardzo podobnie RNA może być wykorzystany jako matryca do syntezy komplementarnego łańcucha RNA, co zresztą i obecnie zachodzi w przypadku niektórych wirusów, na przykład wirusa grypy, którego materiałem genetycznym jest RNA (patrz rozdz. 9).



Rys. 7-36. Replikacja cząsteczki RNA. W pierwszym etapie wyjściowa cząsteczka RNA działa jako matryca do utworzenia cząsteczki RNA o komplementarnej sekwencji. W drugim etapie utworzony komplementarny łańcuch sam działa jako matryca, na której powstają cząsteczki RNA o wyjściowej sekwencji. Ponieważ każda cząsteczka o właściwościach matrycowych może produkować wiele kopii nici komplementarnych, reakcje te powodują rozmnożenie sekwencji wyjściowej

Rys. 7-37. Rybozym. *Nieskomplikowana cząsteczka RNA katalizuje zerwanie innej cząsteczki RNA w specyficznym miejscu. Stwierdzono, że rybozym tego typu jest wbudowany w większe genomy RNA, zwane wiroidami, które infekują rośliny. Zerwanie łańcucha (w miejscu odległym od rybozymu), które następuje w przyrodzie w obrębie tej samej cząsteczki RNA, która zawiera rybozym, stanowi etap replikacji genomu wiroida. Reakcja wymaga jonu magnezowego (nie zaznaczony na rysunku), który wiąże się z miejscem zerwania substratu. (Adaptacja z: T.R. Cech, O.C. Uhlenbeck, Nature 327: 39–40, 1994)*



Synteza polinukleotydów na zasadzie doboru monomerów komplementarnych do matrycy wymaga jednak także katalizatorów, faworyzujących reakcje polimeryzacji: bez nich powstawanie polimeru jest powolne, obarczone błędami i mało wydajne. Współcześnie bardzo szybką polimeryzację nukleotydów katalizują enzymy białkowe — takie jak polimeraza DNA lub RNA. Jak to jednak było w prebiotycznym bulionie, w którym nie istniały jeszcze białka ze swymi zdolnościami katalitycznymi? Początki odpowiedzi na to pytanie uzyskano w 1982 r., kiedy odkryto, że cząsteczki RNA same mogą działać jako katalizatory. W tym rozdziale zobaczyliśmy, że cząsteczka RNA jest katalizatorem reakcji transpeptydacji, zachodzącej na rybosomie. Przypuszcza się, że wyjątkowa zdolność cząsteczek RNA do pełnienia funkcji nośnika informacji i równocześnie funkcji katalizatora, umożliwiła im odegranie centralnej roli w powstaniu życia.

W komórkach współczesnych organizmów RNA jest syntetyzowany w postaci jednoniciowych cząsteczek, zdolnych do tworzenia helikalnych struktur z wzajemnie komplementarnych odcinków tej samej cząsteczki (patrz rys. 7-5). Wraz z możliwością tworzenia się niekonwencjonalnych par zasad powoduje to fałdowanie się cząsteczki RNA w niepowtarzalny sposób, zdeterminowany przez jej sekwencję nukleotydową. Skomplikowany sposób przestrzennego fałdowania się decyduje, że cząsteczka RNA jako całość uzyskuje wyjątkowy kształt.

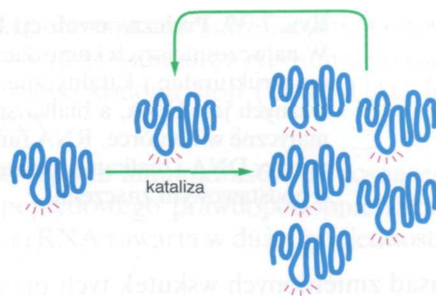
Jak widzieliśmy w poprzednich rozdziałach, enzym białkowy może katalizować reakcje biochemiczne dzięki kształtowi i chemicznym właściwościom powierzchni, na której dochodzi do reakcji substratów (rozdz. 5). W ten sam sposób mogą działać jako enzymy cząsteczki RNA o podobnie niepowtarzalnych kształtach (rys. 7-37), chociaż fakt że składają się one tylko z czterech różnych jednostek monomerycznych, ogranicza ich efektywność i zakres katalizowanych reakcji w porównaniu z enzymami

Tabela 7-2. Reakcje katalizowane przez rybozymy

Aktywność	Rybozym
Zrywanie RNA, ligacja RNA	autokatalityczne RNA
Zrywanie DNA	autokatalityczne RNA
Tworzenie wiązań peptydowych podczas biosyntezy białek	rybosomowe RNA (?)
Ligacja DNA	RNA z selekcji *in vitro*
Splicing RNA	snRNA spliceosomu, autokatalityczne RNA
Polimeryzacja RNA	RNA z selekcji *in vitro*
Fosforylacja RNA	RNA z selekcji *in vitro*
Aminoacylacja RNA	RNA z selekcji *in vitro*
Alkilowanie RNA	RNA z selekcji *in vitro*
Izomeryzacja (obrót wiązania C—C)	RNA z selekcji *in vitro*

białkowymi. Niemniej znaleziono naturalne lub skonstruowano laboratoryjnie takie RNA, które katalizują całkiem dużą rozmaitość reakcji (tab. 7-2). RNA o właściwościach katalitycznych są nazywane **rybozymami**. W komórkach współcześnie żyjących organizmów występuje stosunkowo niewiele katalitycznych RNA — większość funkcji katalitycznych została przejęta przez białka. Ale procesy, w których katalityczne RNA odgrywają, jak się wydaje, główną rolę, obejmują niektóre podstawowe etapy ekspresji informacji genetycznej, a szczególnie splicing i niektóre etapy translacji.

RNA ma więc wszystkie te właściwości, których oczekujemy od cząsteczki zdolnej do katalizowania swojej syntezy (rys. 7-38), a które przypuszczalnie stanowiły ważny instrument procesu powstawania pierwotnych komórek. Obecnie nie znajdujemy naturalnych RNA zdolnych do samoreplikacji, ale istnieje przekonanie, że można je skonstruować laboratoryjnie. Nie stanowiłoby to wprawdzie absolutnego dowodu roli samoreplikujących się cząsteczek RNA w powstawaniu życia na Ziemi, sugerowałoby jednak, że tego rodzaju scenariusz jest możliwy.



Rys. 7-38. Cząsteczka RNA, która może katalizować swoją własną syntezę. Ten hipotetyczny proces wymagałby katalizowania obydwóch etapów pokazanych na rys. 7-36. *Czerwonymi „promieniami”* oznaczono miejsce aktywne takiego enzymu typu RNA

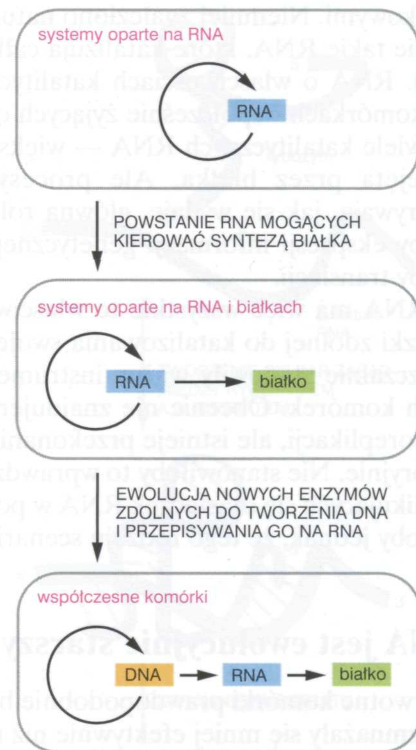
RNA jest ewolucyjnie starszy niż DNA

Pierwotne komórki prawdopodobnie były znacznie mniej skomplikowane i rozmnażały się mniej efektywnie niż nawet najprostsze spośród obecnie żyjących, ponieważ katalizatory typu RNA działają nie tak wydajnie jak białkowe. Zakłada się, że komórki takie zawierały niewiele więcej niż prostą błonę otaczającą zestaw cząsteczek zdolnych do autokatalitycznej replikacji i kilka innych składników służących w tym procesie jako źródło materiałów i energii. Jeśli poprzednio przedstawione spekulacja dotyczące RNA są poprawne, to pierwotne komórki byłyby zasadniczo różne od funkcjonujących obecnie, gdyż ich dziedziczne informacje były zawarte w RNA, a nie w DNA.

Przesłanki poglądu, że RNA pojawił się w ewolucji przed DNA, wynikają z różnic chemicznych między RNA i DNA. Ryboza (patrz rys. 7-3), podobnie jak glukoza i inne proste węglowodany, łatwo powstaje z aldehydu mrówkowego (HCHO), który jest jednym z podstawowych produktów otrzymywanych w eksperymentach symulujących warunki pierwotnej Ziemi. Synteza deoksyrybozy jest znacznie trudniejsza. We współczesnych komórkach powstaje ona z rybozy w reakcji katalizowanej przez białkowy enzym, a więc ryboza musi poprzedzać pojawienie się deoksyrybozy. Prawdopodobnie DNA pojawił się na scenie ewolucji później, ale okazał się lepszym materiałem do trwałego przechowywania informacji niż RNA. W szczególności deoksyryboza decyduje, że łańcuchy cukrowo-fosforanowe DNA są chemicznie bardziej stabilne niż łańcuchy RNA, dzięki czemu DNA mógł tworzyć cząsteczki dłuższe i mniej narażone na uszkodzenia.

Inne różnice pomiędzy RNA i DNA — dwuniciowa helikalna struktura DNA i wykorzystanie do jego budowy tyminy zamiast uracylu — decydując o łatwości procesów naprawczych, także zwiększają stabilność DNA. W poprzednim rozdziale przedstawiono, że jeden z łańcuchów dwuniciowej cząsteczki może służyć jako matryca do naprawy uszkodzeń w drugim łańcuchu. Jedna z najmniej pożądanych zmian chemicznych, której ulega zarówno RNA jak i DNA, polega na spontanicznej utracie grup aminowych przez zasady (deaminacja), co zmienia ich chemiczny charakter i zdolność do tworzenia komplementarnych par (patrz rys. 6-27 i 6-29). Dla ochrony informacji zawartych w cząsteczkach polinukleotydów, komórka powinna mieć enzymy zdolne do rozpoznania

Rys. 7-39. Podczas ewolucji RNA powstał przed DNA i białkami. W najwcześniejszych komórkach RNA łączył w sobie funkcje genetyczne, strukturalne i katalityczne. Obecnie magazynem informacji genetycznych jest DNA, a białka spełniają prawie wszystkie funkcje enzymatyczne w komórce. RNA funkcjonuje głównie w roli pośrednika pomiędzy DNA i białkami, ale nadal pozostał katalizatorem kilku reakcji o podstawowym znaczeniu



zasad zmienionych wskutek tych procesów i zamiany uszkodzonych zasad na poprawne. Produktem deaminacji cytozyny niestety jest uracyl, który jest normalnym składnikiem RNA, a więc enzymy naprawcze nie mogą wykryć i naprawić uszkodzenia powstałego w RNA w rezultacie przekształcenia C w U. Natomiast w DNA, który zamiast U normalnie zawiera T, uracyl powstały wskutek przypadkowej deaminacji C może być łatwo wykryty a uszkodzone miejsce naprawione.

Wzięte razem, dyskutowane przesłanki przekonująco wskazują, że RNA, mający właściwości zarówno genetyczne, jak i katalityczne, ewolucyjnie poprzedzał DNA. Ten etap ewolucji komórek nazywano *światem RNA*. Przyjmuje się, że w miarę coraz większego upodabniania się komórek pierwotnych do obecnie żyjących — coraz więcej funkcji spełnianych przez RNA przejmowały cząsteczki lepiej dostosowane do wypełniania tych zadań. Ostatecznie podstawowe funkcje materiału genetycznego przejął DNA, białka przejęły funkcje katalityczne, a dla RNA pozostała rola pośrednika między nimi (rys. 7-39). Z pojawieniem się DNA komórki mogły stać się bardziej skomplikowane, gdyż mogły zawierać i przekazywać więcej informacji, niż wykorzystując w tym celu cząsteczki RNA. Ze względu na większą złożoność chemiczną białek i różnorodność katalizowanych przez nie reakcji, przejście od RNA do białek otwarło znacznie bogatsze źródło enzymów komórkowych i składników strukturalnych. Umożliwiło to komórkom wytworzenie ogromnej różnorodności struktur i funkcji, jaką obserwujemy we współczesnych organizmach.

Pytanie 7-7. Przedyskutuj następujące twierdzenie: „Podczas ewolucji życia na Ziemi RNA został pozbawiony chlubnej pozycji pierwszego samoreplikującego się katalizatora. Obecnie pełni prostą funkcję posłańca przekazującego informacje od DNA do białka".

Streszczenie

- Przepływ informacji genetycznej we wszystkich żywych komórkach odbywa się w kierunku DNA → RNA → białko. Przekształcenie informacji genetycznej w RNA i białka nazywamy ekspresją genów.
- Aby informacja genetyczna zawarta w DNA uległa ekspresji, sekwencja nukleotydów jakiegoś genu najpierw jest transkrybowana na RNA. Transkrypcję katalizuje enzym, polimeraza RNA. DNA zawiera sygnały informujące polimerazę RNA o miejscach początku i końca transkrypcji.
- RNA różni się od DNA pod kilkoma względami. RNA zawiera cukier rybozę zamiast deoksyrybozy i uracyl (U) zamiast tyminy (T). RNA są syntetyzowane w komórkach w formie cząsteczek jednoniciowych, które fałdując się przybierają precyzyjny kształt przestrzenny.
- Komórki wytwarzają kilka rodzajów funkcjonalnych cząsteczek RNA, w tym: informacyjne RNA (mRNA) noszące instrukcje o syntezie białek, rybosomowe RNA (rRNA) będące składnikami rybosomów, oraz transportujące RNA (tRNA), które działają jako cząsteczki adaptorowe podczas syntezy białek.
- Większość genów w eukariotycznych DNA jest rozszczepionych na szereg mniejszych rejonów kodujących (eksony), porozdzielanych sekwencjami niekodującymi (introny).
- Transkrypcji ulegają zarówno eksony, jak i introny, tworząc pierwotny transkrypt.
- Introny są usuwane z pierwotnych transkryptów w jądrze komórkowym w procesie określanym jako splicing RNA. Reakcję tę katalizują małe kompleksy rybonukleoproteinowe, znane jako snRNP. Introny są wycinane z pierwotnego transkryptu i odrzucane,

a eksony ulegają połączeniu. Dojrzały mRNA jest następnie eksportowany z jądra do cytoplazmy.

- Translacja sekwencji nukleotydowej mRNA na białko odbywa się w cytoplazmie na dużych cząstkach rybonukleoproteinowych, zwanych rybosomami. Rybosomy wiążą się z mRNA, stopniowo przesuwają się wzdłuż łańcucha mRNA i zgodnie z zawartą w nim informacją syntetyzują białko.
- Informacja zawarta w mRNA jest odczytywana w zestawach (kodonach) obejmujących trzy kolejne nukleotydy. Każdy kodon odpowiada jednemu aminokwasowi.
- Relacje między aminokwasami a kodonami dyktuje kod genetyczny. Kod genetyczny obejmuje 64 kodony, stanowiące wszystkie możliwe kombinacje trójek tworzone przez 4 różne nukleotydy wchodzące w skład RNA. Większość aminokwasów jest kodowana przez więcej niż jeden kodon.
- tRNA działają podczas syntezy białek jako cząsteczki adaptorowe. Enzymy, nazywane syntetazami aminoacylo-tRNA, łączą aminokwasy z odpowiednimi tRNA. Każda cząsteczka tRNA ma sekwencję trzech nukleotydów stanowiących antykodon, za pośrednictwem których tRNA odczytuje komplementarne kodony w mRNA.
- Synteza białka rozpoczyna się od asocjacji podjednostek rybosomowych z mRNA w miejscu kodonu inicjującego (AUG). W regulacji inicjacji uczestniczą białka nazywane czynnikami inicjującymi. Gotowy łańcuch białkowy jest uwalniany z rybosomu po osiągnięciu przez niego kodonu stop (UAA, UAG lub UGA) na mRNA.
- Przyłączanie kolejnych aminokwasów do rosnącego łańcucha polipeptydowego prawdopodobnie katalizuje cząsteczka rRNA zawarta w dużej podjednostce rybosomowej.
- Degradacja białek w komórkach podlega precyzyjnej kontroli. Niektóre białka są degradowane w cytoplazmie przez duże kompleksy białkowe nazywane proteosomami.
- Na podstawie znajomości współczesnych organizmów i zawartych w nich cząsteczek wydaje się prawdopodobne, że ewolucja układów żywych rozpoczęła się od cząsteczek RNA zdolnych katalizować swoją replikację.
- Przyjęto pogląd, że w miarę ewolucji komórek dwuniciowa helisa DNA, stabilniejsza od RNA, zastąpiła go w pełnieniu funkcji nośnika informacji genetycznej, a białka zastąpiły RNA w pełnieniu funkcji katalitycznych i strukturalnych.
- Przepływ informacji we współcześnie żyjących komórkach przebiega w kierunku DNA → RNA → białko, przy czym RNA pełni funkcje pośrednika. Jednak niektóre ważne reakcje nadal są katalizowane przez RNA, co wydaje się pozostałością pierwotnie istniejącego świata RNA.

Hasła

antykodon
autokatalityczny proces
czynnik inicjujący
dojrzewanie RNA
ekson
inicjatorowy tRNA
intron
kod genetyczny
kodon
mRNA
pierwotny transkrypt
polimeraza RNA
promotor
proteaza
proteoliza
proteosom
ramka odczytu
rRNA
rybosom
rybozym
snRNP
splicing RNA
syntetazy aminoacylo-tRNA
transkrypcja
translacja
tRNA

Pytania

Pytanie 7-8. Które z następujących twierdzeń jest prawdziwe? Wyjaśnij odpowiedź.

A. Pojedynczy rybosom może produkować tylko jeden rodzaj białka.

B. Wszystkie mRNA ulegają pofałdowaniu w określone trójwymiarowe struktury potrzebne do ich translacji.

C. Podjednostki rybosomowe — duża i mała poszczególnego rybosomu zawsze trzymają się razem i nigdy nie wymieniają partnerów.

D. Rybosomy są cytoplazmatycznymi organellami, otoczonymi pojedynczą błoną.

E. Ponieważ dwie nici DNA są wzajemnie komplementarne, mRNA danego genu może być syntetyzowany na którejkolwiek z nich, wykorzystywanej jako matryca.

F. Informacyjny RNA może zawierać sekwencję ATTGACCCCGGTCAA.

G. Stężenie białka znajdującego się w komórce zależy od szybkości jego syntezy, jego aktywności katalitycznej oraz od szybkości jego degradacji.

Pytanie 7-9. „Rozweselina" jest hipotetycznym białkiem, które powoduje u ludzi chęć do częstego śmiechu. U osobników chronicznie ponurych jest ono nieaktywne. mRNA pochodzący od pewnej liczby ponurych osobników, należących do jednej rodziny, wykazał brak wewnętrznego odcinka o długości 173 nukleotydów, który występował jednak w „rozweselinowym" mRNA wyizolowanym z kontrolnej grupy osób radosnych. Porównano sekwencje DNA genów „rozweseliny" z rodzin ponurych i radosnych. Stwierdzono, że różnią się one tylko jednym nukleotydem, ale żaden nukleotyd nie uległ delecji. Stwierdzono ponadto, że różnica sekwencji występuje w obrębie intronu. Co można powiedzieć o molekularnych podstawach rodzinnie występującego ponuractwa?

Wskazówka: należy oddzielnie rozważyć dwa zagadnienia. 1) Czy można wymyślić hipotetyczny mechanizm molekularny powodujący, że zamiana jednego nukleotydu w genie wywoła obserwowaną delecję w mRNA? Zauważ, że chodzi o delecję wewnętrznego odcinka mRNA. 2) Jakie skutki w „rozweselinie" wywołałoby usunięcie z jej mRNA wewnętrznego odcinka o długości 173 nukleotydów? Zakładamy, że delecja w tym mRNA nastąpiła w obrębie rejonu kodującego białko.

Pytanie 7-10. Posługując się kodem genetycznym, pokazanym na rys. 7-20, określ, która z poniższych sekwencji nukleotydowych mogłaby kodować sekwencję aminokwasów Arg-Gly-Asp

1. 5′-AGA-GGA-GAU-3′
2. 5′-ACA-CCC-ACU-3′
3. 5′-GGG-AAA-UUU-3′
4. 5′-CGG-GGU-GAC-3′

Pytanie 7-11. Między antykodonem tRNA a trzema nukleotydami stanowiącymi kodon w mRNA tworzą się wiązania „____". Uzupełnij to zdanie każdą z poniżej podanych opcji i wytłumacz, dlaczego odpowiednie twierdzenia są prawdziwe lub nieprawdziwe.

A. kowalencyjne powstające kosztem hydrolizy GTP.

B. wodorowe powstające, gdy tRNA znajduje się w miejscu A na rybosomie.

C. zrywane wskutek translokacji rybosomu wzdłuż mRNA.

Pytanie 7-12. Wypisz normalne, „słownikowe" znaczenie słów *replikacja*, *transkrypcja* i *translacja*. Obok wypisz znaczenia, jakie mają te słowa użyte w odniesieniu do procesów zachodzących w żywej komórce.

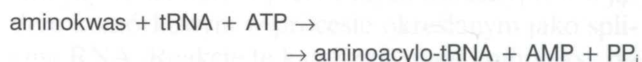
Pytanie 7-13. W innym świecie kod genetyczny jest zapisany w dwójkach nukleotydów (kod dubletowy). Ile aminokwasów może on kodować? W jeszcze innym świecie wykorzystywany jest kod trypletowy, ale sekwencja nukleotydów jest nieistotna. Liczy się jedynie to, jakie nukleotydy występują w danym tryplecie. Ile aminokwasów może kodować taki system? Czy spodziewałbyś się jakichś trudności podczas translacji tak działającego kodu genetycznego?

Pytanie 7-14. Jedną z istotnych cech kodu genetycznego jest to, że aminokwasy o podobnych właściwościach chemicznych często mają podobne kodony. Tak więc kodony zawierające jako drugą literę U lub C wykazują tendencję do kodowania aminokwasów hydrofobowych. Czy mógłbyś zasugerować możliwe wytłumaczenie tego zjawiska uwzględniając wczesne etapy ewolucji aparatu syntezy białka?

Pytanie 7-15. Mutacja w DNA powoduje powstanie kodonu UGA („stop") w środku mRNA kodującego określone białko. Druga mutacja w komórce prowadzi do zamiany jednego nukleotydu w tRNA, co umożliwia poprawną translację zmutowanego mRNA, czyli druga mutacja powoduje supresję defektu, spowodowanego przez pierwszą. Zmieniony tRNA rozpoznaje kodon UGA jako kodon tryptofanowy. Jaka zmiana nukleotydu nastąpiła w zmutowanej cząsteczce tRNA? Jaki wpływ na ekspresję normalnych genów w tej komórce wywierałaby obecność zmutowanego tRNA?

Pytanie 7-16. W doskonałym eksperymencie, przeprowadzonym w 1962 r., cysteinę związaną z tRNA przekształcono metodami chemicznymi w alaninę. Cząsteczki tego „hybrydowego" tRNA dodano następnie do bezkomórkowego układu translacyjnego, z którego usunięto normalne cysteinylo-tRNA. Po zbadaniu uzyskanego białka okazało się, że zawiera ono alaninę we wszystkich tych pozycjach, w których normalnie zawierało cysteinę. Co ten eksperyment mówi o roli syntetaz aminoacylo-tRNA podczas normalnej translacji kodu genetycznego?

Pytanie 7-17. Przyłączenie aminokwasu do tRNA można przedstawić równaniem:



aminokwas + tRNA + ATP → aminoacylo-tRNA + AMP + PP_i

gdzie PP_i oznacza pirofosforan (patrz rys. 3-34). Reszta aminokwasu w aminoacylo-tRNA jest połączona z tRNA wiąza-

niem bogatym w energię (patrz rozdz. 3). Znaczna część tej energii pochodzi z hydrolizy ATP i dzięki jej zmagazynowaniu w wiązaniu aminokwas – tRNA może być wykorzystana do tworzenia wiązania peptydowego w późniejszym etapie biosyntezy białka. Zmiana swobodnej energii reakcji wiązania aminokwasu z tRNA w przedstawionym równaniu jest bliska zeru i dlatego nie należałoby się spodziewać, by faworyzowała jej przebieg w kierunku aminoacylo-tRNA. Zaproponuj następny etap reakcji, który napędzałby reakcję w kierunku powstawania aminoacylo-tRNA.

Pytanie 7-18.

A. Przeciętna masa cząsteczkowa białek zawartych w komórce wynosi około 30 000 Da. Jednak kilka białek jest znacznie większych. Największy znany łańcuch polipeptydowy (wytwarzany przez komórki mięśniowe) jest zawarty w białku zwanym tityną — jego masa cząsteczkowa wynosi 3 000 000 Da. Oszacuj czas potrzebny do translacji mRNA kodującego titynę (przyjmując średnią masę cząsteczkową reszty aminokwasu równą 120 Da i szybkość translacji w komórkach eukariotycznych 2 aminokwasy na sekundę).

B. Synteza białka jest bardzo dokładna: na 10 000 aminokwasów wbudowywanych do polipeptydów tylko jeden jest włączany błędnie. Jaka część cząsteczek białkowych o przeciętnej masie i jaka część cząsteczek tityny nie zawiera żadnego błędu? Wskazówka: prawdopodobieństwo (P) syntezy bezbłędnego białka określa wzór $P = (1-E)^n$, gdzie E jest częstością występowania błędu, a n liczbą aminokwasów.

C. Suma mas cząsteczkowych białek rybosomowych wynosi $2,5 \cdot 10^6$ daltonów. Czy byłoby korzystne dla komórki syntetyzowanie ich w postaci jednego dużego białka?

D. Transkrypcja przebiega z szybkością około 30 nukleotydów na sekundę. Czy można na tej podstawie obliczyć czas potrzebny na zsyntetyzowanie mRNA kodującego titynę?

Pytanie 7-19. Które z następujących mutacji byłyby niebezpieczne dla organizmu? Uzasadnij odpowiedzi.

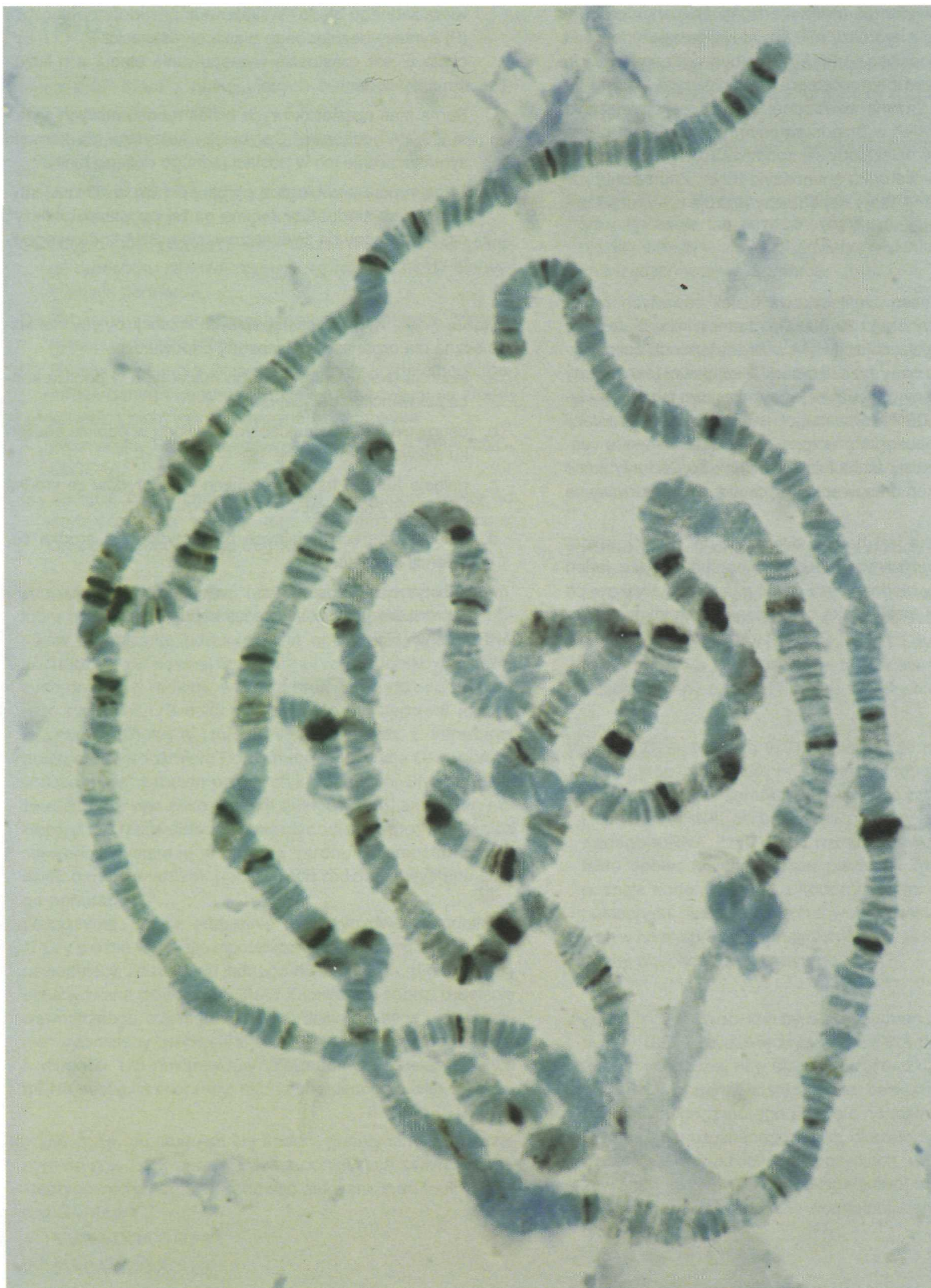
a. insercja (wstawienie) jednego nukleotydu w pobliżu końca sekwencji kodującej białko,

b. usunięcie jednego nukleotydu z rejonu w pobliżu początku sekwencji kodującej,

c. delecja (utrata) trzech kolejnych nukleotydów ze środka sekwencji kodującej,

d. delecja czterech kolejnych nukleotydów ze środka sekwencji kodującej,

e. substytucja (podstawienie) jednego nukleotydu innym w środkowej części sekwencji kodującej.



W gruczołach ślinowych muszki owocowej *Drosophila* występują wielkie komórki z olbrzymimi chromosomami. Każdy z tych chromosomów zawiera ponad tysiąc równolegle ułożonych, identycznych cząsteczek DNA. Z tego powodu chromosomy olbrzymie można łatwo zobaczyć w mikroskopie świetlnym, gdzie mają charakterystyczny i powtarzalny układ prążków. Tego typu chromosomy są szeroko stosowane w badaniach ekspresji genów. Na przedstawionej mikrografii ciemno wybarwione prążki uwidaczniają pozycje białek związanych z regionami regulatorowymi ponad 60 genów, których ekspresję kontrolują. Białka wybarwiono za pomocą przeciwciał. (Dzięki uprzejmości: B. Zink, R. Paro, z: R. Paro, *Trends Genet*. 6: 416–421, 1990)

8

Chromosomy i regulacja genów

STRUKTURA CHROMOSOMÓW EUKARIOTYCZNYCH

- Eukariotyczny DNA jest upakowany w chromosomy
- Stan chromosomów zmienia się podczas cyklu życiowego komórki
- Wyspecjalizowane sekwencje DNA zapewniają wydajną replikację chromosomów
- Podstawowymi jednostkami struktury chromatyny są nukleosomy
- Chromosomy mają kilka poziomów upakowania DNA
- Chromosomy interfazowe zawierają zarówno skondensowane jak i rozproszone formy chromatyny
- Wpływ efektu pozycyjnego na ekspresję genów ujawnia różnice w upakowaniu chromosomów interfazowych
- Chromosomy interfazowe występują w jądrze w sposób zorganizowany

REGULACJA GENÓW

- Komórki regulują ekspresję swoich genów
- Transkrypcję kontrolują białka wiążące się z sekwencjami regulatorowymi DNA
- Geny są „wyłączane" przez represory, a „włączane" przez aktywatory
- Inicjacja transkrypcji genów eukariotycznych jest procesem złożonym
- Eukariotyczna polimeraza RNA potrzebuje ogólnych czynników transkrypcyjnych
- Eukariotyczne białka regulatorowe mogą kontrolować ekspresję oddalonych genów
- Na inicjację transkrypcji może wpływać uwikłanie promotorowej sekwencji DNA w nukleosomy
- Geny eukariotyczne są regulowane przez kombinacje białek
- Jedno białko może koordynować ekspresję różnych genów
- Kombinatoryczna kontrola może prowadzić do powstawania różnych typów komórek
- Stabilne wzorce ekspresji genów mogą być przekazywane do komórek potomnych
- Tworzenie się całego organu może być wywołane przez pojedyncze białko regulatorowe genu

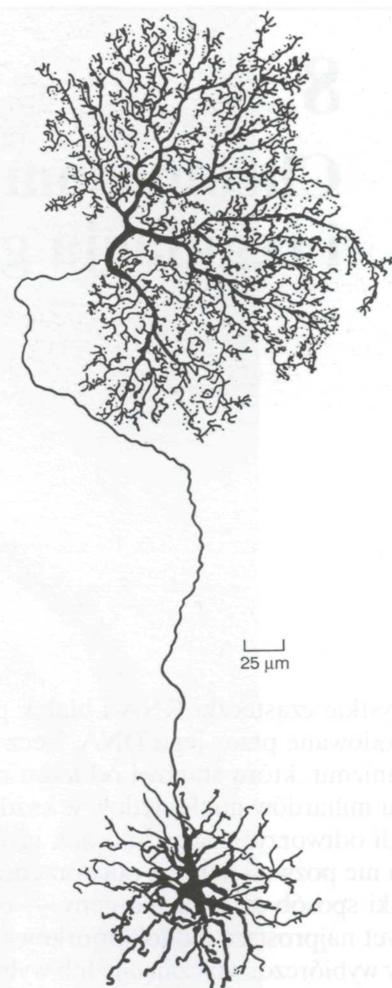
Wszystkie cząsteczki RNA i białek potrzebne do utworzenia organizmu są kodowane przez jego DNA. Lecz poznając całkowitą sekwencję DNA organizmu, którą stanowi od kilku milionów nukleotydów u bakterii do kilku miliardów nukleotydów w każdej komórce człowieka, nie będziemy mogli odtworzyć organizmu, tak jak znajomość angielskich słów w słowniku nie pozwoli nam na odtworzenie sztuki Szekspira. Musimy wiedzieć, w jaki sposób są używane geny — określone elementy sekwencji DNA. Nawet najprostsza jednokomórkowa bakteria może wykorzystywać swoje geny wybiórczo, włączając je lub wyłączając, aby wytwarzać różne enzymy metaboliczne zależnie od dostępności źródeł pożywienia.

U wielokomórkowych roślin i zwierząt ekspresja genów jest kontrolowana w sposób znacznie bardziej złożony. W trakcie rozwoju embrionalnego zapłodniona komórka jajowa daje początek wielu typom komórek, radykalnie różniącym się zarówno strukturą, jak i funkcją. Na przykład, różnice pomiędzy neuronem a limfocytem ssaka są tak wielkie, że trudno sobie wyobrazić, iż te dwie komórki zawierają ten sam DNA (rys. 8-1). Z tego powodu, jak również dlatego, że komórki w dorosłym organizmie rzadko tracą swoje charakterystyczne cechy, biologowie podejrzewali, że geny mogą być selektywnie tracone podczas specjalizacji komórki. Obecnie wiemy, że wszystkie komórki wielokomórkowego organizmu zawierają ten sam genom, a ich różnicowanie się jest rezultatem zmian w ekspresji genów.

Setki różnych typów komórek wykonują specyficzne funkcje zależnie od genów, które są włączane (tzn. ulegają ekspresji) tylko w danym typie komórek: na przykład komórki β trzustki wytwarzają hormon białkowy — insulinę, podczas gdy komórki α trzustki produkują hormon glukagon; limfocyty układu immunologicznego są jedynymi komórkami ciała zdolnymi do tworzenia przeciwciał, a rozwijające się erytrocyty — jedynymi komórkami wytwarzającymi białko transportujące tlen — hemoglobinę. Różnice między neuronem, limfocytem, komórką trzustki i erytrocytem zależą od precyzyjnej kontroli ekspresji genów. W każdym przypadku komórka używa jedynie niektórych genów spośród całego ich zestawu.

Aby zakodować całą informację potrzebną do zbudowania jednokomórkowej bakterii, konieczna jest wielka ilość DNA, ale potrzeba go znacznie więcej, by zapisać instrukcje niezbędne do rozwoju organizmu

Rys. 8-1. Neuron i limfocyt ssaka. Neuron z siatkówki oka może długimi i rozgałęzionymi wypustkami odbierać sygnały elektryczne z wielu komórek i przekazywać je do wielu sąsiadujących komórek. Limfocyt jest białą krwinką swobodnie przemieszczającą się w ciele, zaangażowaną w odpowiedź immunologiczną na infekcje. Obie komórki zawierają ten sam genom, ale wytwarzają różne RNA i białka



wielokomórkowego. Stwarza to pytanie: w jaki sposób DNA może być pofałdowany i upakowany, stając się tak skondensowany, że z łatwością może się zmieścić w jądrze komórkowym? W komórkach eukariotycznych niezmiernie długie dwuniciowe cząsteczki DNA są upakowane poprzez połączenie się z wyspecjalizowanymi białkami w *chromosomy*, które łatwo dopasowują się do wnętrza jądra i mogą być prawidłowo rozdzielane pomiędzy dwie potomne komórki podczas każdego podziału komórkowego. Upakowanie jest prowadzone w pewien uporządkowany sposób, który, gdy jest to konieczne, umożliwia transkrypcję lub replikację określonych genów zawartych w cząsteczkach DNA.

Rozpoczniemy ten rozdział od opisu, w jaki sposób DNA jest upakowany w chromosomy eukariotyczne oraz jakie zmiany zachodzą w strukturze chromosomów podczas różnych faz cyklu życiowego komórki. Następnie w drugiej części rozdziału przedyskutujemy główne sposoby kontroli ekspresji genów w komórkach bakteryjnych i eukariotycznych. Chociaż niektóre mechanizmy kontroli są wykorzystywane w obu rodzajach komórek, komórki eukariotyczne, ze względu na ich bardziej złożoną strukturę chromosomową, mają sposoby kontroli ekspresji genów niedostępne komórkom bakterii.

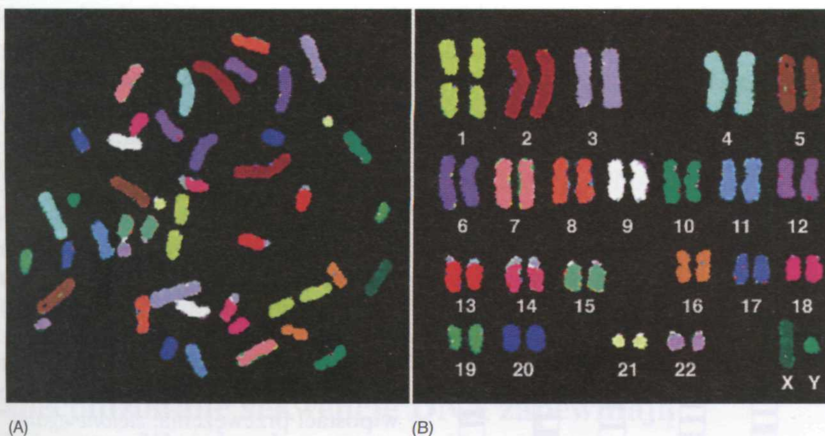
Struktura chromosomów eukariotycznych

Jądro typowej komórki ludzkiej ma średnicę 5–8 µm i zawiera DNA o ogólnej długości ok. 2 m, co jest równoważne piłce tenisowej zawierającej 20 km niezmiernie cienkiej nici. W tym podrozdziale zobaczymy, że złożone zadanie upakowania DNA realizują wyspecjalizowane białka, które wiążąc się z DNA zaginają go, tworząc uporządkowane ciągi zwojów i pętli. Dzięki tym białkom DNA przybiera coraz wyższy stopień organizacji, one zabezpieczają go przed utworzeniem plątaniny wymykającej się spod kontroli. Zdumiewające jest, że skondensowany DNA pozostaje dostępny dla wszystkich enzymów i innych białek koniecznych do transkrypcji, replikacji i naprawy DNA.

Eukariotyczny DNA jest upakowany w chromosomy

U eukariotów, czyli u nas samych, DNA w jądrze jest rozdzielony pomiędzy komplet różnych **chromosomów**. Każdy chromosom składa się z jednej, niezmiernie długiej liniowej cząsteczki DNA związanej z białkami, które zaginają i pakują cienką nić DNA w strukturę bardziej skondensowaną. Kompleks DNA i białek nazywa się *chromatyną* (grec. chroma — kolorowy), ze względu na możliwość jej wybarwienia. Białka związane z DNA w chromosomach są zaangażowane w procesy upakowania DNA, ale chromosomy współdziałają też z innymi białkami, które są konieczne do ekspresji genów, replikacji i naprawy DNA.

Bakterie zwykle mają wszystkie swoje geny na jednej kolistej cząstecz-



Rys. 8-2. Chromosomy człowieka. Chromosomy wyizolowano z komórki mężczyzny, która przechodziła podział (mitozę), i dlatego występują w postaci silnie skondensowanej. Każdy chromosom zabarwiono odmiennym kolorem, aby umożliwić jednoznaczną identyfikację w mikroskopie świetlnym. Chromosomy barwiono za pomocą zbioru ludzkich cząsteczek DNA, połączonych z kombinacjami barwników fluorescencyjnych. Na przykład cząsteczki DNA pochodzące z chromosomu 1 wyznakowano jedną, specyficzną kombinacją barwników, a pochodzące z chromosomu 2 — inną i tak dalej. Ponieważ wyznakowany DNA może tworzyć pary zasad, czyli hybrydyzować, tylko z chromosomem, od którego pochodzi (zobacz rozdział 10), każdy chromosom jest inaczej wyznakowany. Aby przeprowadzić takie doświadczenie, chromosomy potraktowano czynnikami, które rozdzieliły dwuniciową helisę DNA na dwie osobne nici, zdolne do utworzenia par zasad z jednoniciowymi, wyznakowanymi cząsteczkami DNA, ale jednocześnie struktura chromosomu pozostała względnie nienaruszona. (A) Chromosomy uwidocznione tak, jak zostały uwolnione z komórki poddanej lizie. (B) Te same chromosomy sztucznie uporządkowane. Tak ułożony komplet chromosomów nazywa się kariotypem. (Z: E. Schröck et al., *Science* 273: 494–497, 1996)

ce DNA, która również jest związana z białkami kondensującymi (innymi niż te, które występują u eukariotów), stąd też często jest ona nazywana chromosomem bakteryjnym. Nie ma on takiej samej struktury jak chromosomy eukariotyczne i niewiele wiadomo na temat upakowania DNA bakteryjnego. W tym rozdziale dyskusja na temat struktury chromosomu skupi się wyłącznie na chromosomach eukariotycznych.

Każda komórka człowieka, z wyjątkiem komórek rozrodczych, ma dwie kopie każdego chromosomu: jedną odziedziczoną po matce, a drugą po ojcu; matczyne i ojcowskie chromosomy jednej pary nazywane są *chromosomami homologicznymi*. Jedyną parą chromosomów niehomologicznych są chromosomy płciowe u mężczyzn, gdzie *chromosom Y* jest odziedziczony po ojcu, a *chromosom X* po matce. Rysunek 8-2 pokazuje, w jaki sposób można wykorzystać *hybrydyzację* DNA (opisaną w rozdz. 10) w rozpoznawaniu ludzkich chromosomów poprzez barwienie każdego z nich na inny kolor. Jednak standardowym sposobem rozróżniania chromosomów jest wybarwianie ich barwnikami, które wiążą się z określonym typem sekwencji DNA. Barwniki te rozróżniają DNA bogaty w pary nukleotydowe A·T od DNA bogatego w pary G·C, powodując powstawanie powtarzalnego wzoru prążków wzdłuż każdego chromosomu (rys. 8-3). Wzór prążków na każdym typie chromosomu jest unikatowy, co pozwala zidentyfikować i policzyć wszystkie chromosomy. Jeśli część chromosomu została utracona lub wymieniona między chromosomami, to zmiany te można wykryć, obserwując zmiany we wzorze prążków. Zmiany te wykorzystują cytogenetycy do wykrywania anomalii chromosomowych związanych z defektami dziedzicznymi lub z pewnymi typami nowotworów.

Pytanie 8-1. W podwójnej helisie DNA sąsiadujące ze sobą pary nukleotydów są oddalone od siebie o 0,34 nm. Posługując się rys. 8-3 oszacuj długość cząsteczki DNA w chromosomie 1 człowieka, jeśli występowałaby ona w formie rozwiniętej. Podaj, jaki jest stopień kondensacji DNA w chromosomie mitotycznym, wiedząc, że długość chromosomu 1 w tym stadium mitozy wynosi w przybliżeniu 10 μm.

Stan chromosomów zmienia się podczas cyklu życiowego komórki

Chromosomy niemal zawsze przedstawia się tak jak na rys. 8-2 i 8-3; jednak takie chromosomy, w stadium wysoce skondensowanym, normalnie występują tylko w krótkim okresie podczas podziału komórki. W każdym innym czasie chromosomy są rozciągniętymi, długimi, cienkimi i splątanymi nićmi DNA w jądrze i nie można ich w łatwy sposób rozróżnić w mikroskopie świetlnym.

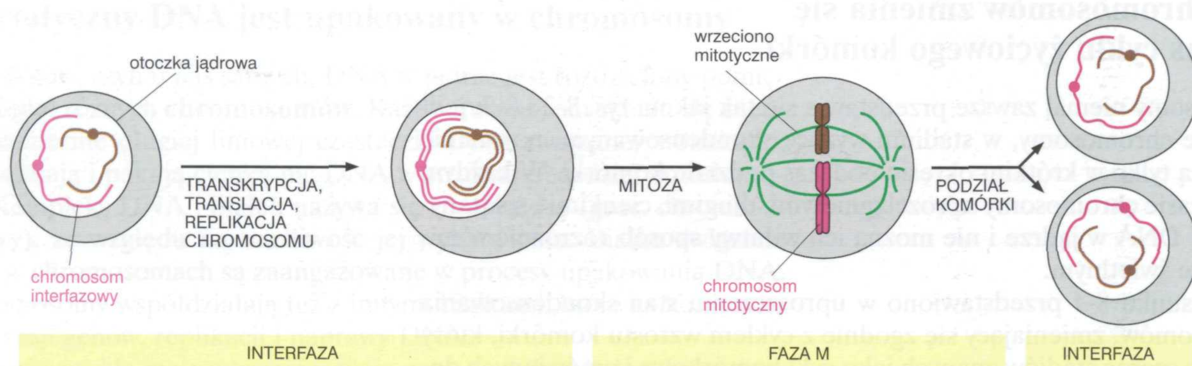
Na rysunku 8-4 przedstawiono w uproszczeniu stan skondensowania chromosomów, zmieniający się zgodnie z cyklem wzrostu komórki, który obejmuje szereg stadiów znanych jako cykl komórkowy i omówionych do-



Rys. 8-3. Wzory prążkowania chromosomów człowieka. Chromosomy od 1 do 22 ponumerowano w przybliżeniu według wielkości. Typowa somatyczna komórka człowieka zawiera po dwa chromosomy każdego typu oraz dwa chromosomy płciowe — dwa chromosomy X u kobiet; jeden chromosom X i jeden Y u mężczyzn. Chromosomy używane do tworzenia takich map wybarwia się w początkowym stadium mitozy, kiedy występują w formie silnie skondensowanej. *Zielona linia* wskazuje pozycję centromeru, który w chromosomach mitotycznych występuje w postaci przewężenia; *zielone „gałki"* na chromosomach 13, 14, 15, 21 i 22 wskazują pozycje genów kodujących wysokocząsteczkowe rybosomowe RNA. Takie wzory otrzymuje się po wybarwieniu chromosomów barwnikiem Giemsy, które powoduje powstawanie ciemnych prążków w regionach bogatych w pary nukleotydów A · T. (Adaptacja z: U. Franke, *Cytogenet. Cell Genet.* 31: 24–32, 1981)

Rys. 8-4. Uproszczony schemat eukariotycznego cyklu komórkowego. Podczas interfazy zachodzi aktywna transkrypcja genów i synteza białka. Jeszcze podczas interfazy i przed podziałem komórkowym DNA ulega replikacji i chromosomy zostają podwojone. Po zakończeniu replikacji DNA komórka wchodzi w *fazę M*, w której następuje mitoza. Mitoza jest podziałem jądra. Podczas tego stadium chromosomy ulegają kondensacji, otoczka jądrowa zostaje rozbita, a z mikrotubul i innych białek tworzy się wrzeciono mitotyczne. Skondensowane chromosomy są wychwytywane przez wrzeciono mitotyczne, które odciąga po jednym pełnym zestawie chromosomów do obu końców komórki. Wokół każdego zestawu chromosomów tworzy się otoczka jądrowa i w końcowym etapie fazy M komórka dzieli się, dając dwie komórki potomne

kładnie w rozdz. 18. W tym rozdziale będą nas interesować tylko dwa stadia komórkowe: *mitoza*, kiedy chromosomy zreplikowane i skondensowane są rozdzielane do dwóch potomnych jąder, i *interfaza*, w trakcie której chromosomy są w formie rozproszonej. Silnie skondensowane chromosomy, występujące w dzielącej się komórce, określa się jako **chromosomy mitotyczne**; natomiast w stosunku do chromosomów w formie rozproszonej będziemy używać nazwy *chromosomy interfazowe*.

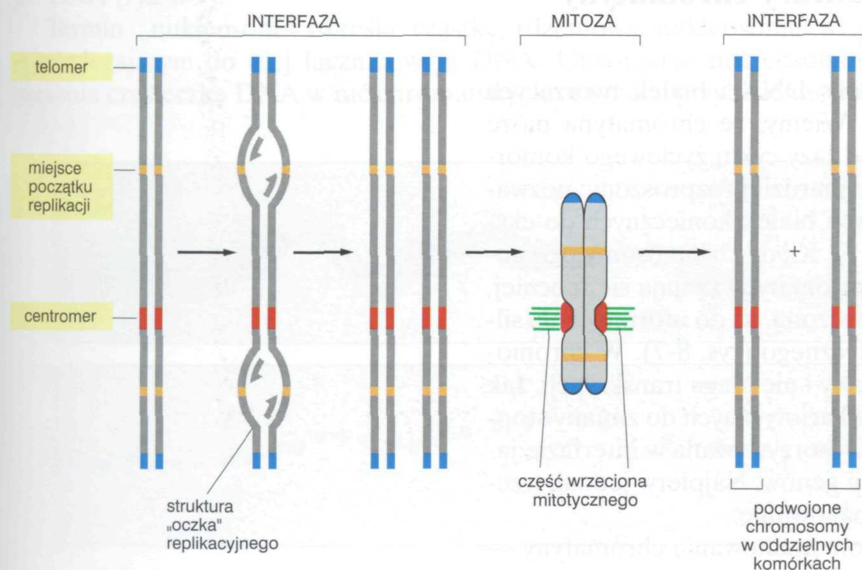


Aby podwojone chromosomy mogły prawidłowo rozdzielić się podczas podziału komórki, muszą występować w stanie skondensowanym. W rozdziale 17 omówimy proces, w którym chromosomy są wychwytywane i rozdzielane do komórek potomnych przez *wrzeciono mitotyczne* (rys. 8-4), złożone z mikrotubul i innych białek dzielącej się komórki. W każdym chromosomie występują wyspecjalizowane sekwencje DNA, które są niezbędne do złączenia się z wrzecionem i przeniesienia kompletnej kopii DNA do każdej z potomnych komórek. Sekwencje te omówimy w następnym podrozdziale, a potem powrócimy do wyspecjalizowanych białek upakowujących DNA.

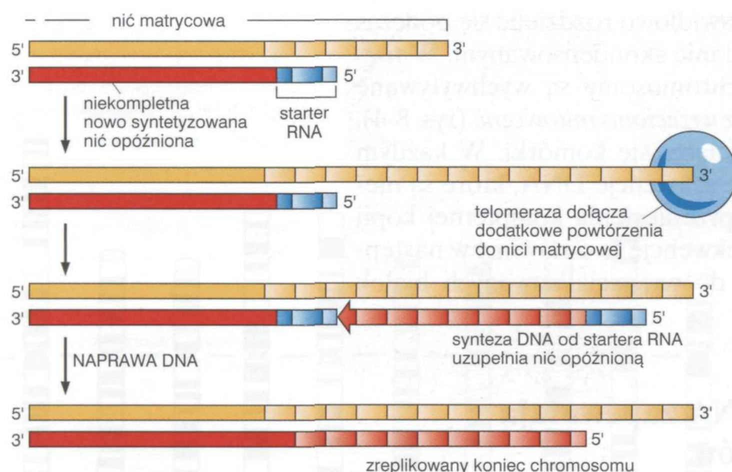
Wyspecjalizowane sekwencje DNA zapewniają wydajną replikację chromosomów

Chromosom działa jako odrębna jednostka strukturalna: każdy chromosom musi być zdolny do replikacji, a nowo powielone kopie muszą następnie zostać oddzielone od siebie i prawidłowo rozdzielić się do dwóch potomnych komórek. Te podstawowe funkcje są kontrolowane przez trzy typy wyspecjalizowanych sekwencji DNA, znajdywanych we wszystkich chromosomach eukariotycznych (rys. 8-5). Pierwszy typ sekwencji działa jako **miejsce inicjacji replikacji** — w tych miejscach rozpoczyna się podwojenie (duplikacja) DNA (patrz rozdz. 6). Większość chromosomów eukariotycznych ma wiele miejsc inicjacji, dzięki czemu chromosomy mogą zostać szybko zreplikowane. Wyspecjalizowane sekwencje DNA drugiego typu, nazywane **centromerem**, umożliwiają podczas podziału komórkowego przekazanie po jednej kopii podwojonego chromosomu do każdej z potomnych komórek. Podczas mitozy w obrębie centromeru formuje się kompleks białek nazywany *kinetochorem*, którego zadaniem jest przyłączenie podwojonych chromosomów do wrzeciona i umożliwienie ich segregacji (patrz rozdz. 17).

Trzeci typ wyspecjalizowanych sekwencji DNA, nazywany **telomerem,** znajduje się na każdym z dwóch końców chromosomu. Telomery zawierają powtórzone sekwencje DNA, dzięki którym chromosomy mogą być replikowane. Ich obecność jest konieczna, ponieważ, jak wskazaliśmy w rozdz. 6, polimeraza DNA może syntetyzować DNA jedynie w kierunku 5′ → 3′. Nić opóźniona w widełkach replikacyjnych



Rys. 8-5. Trzy elementy sekwencji DNA niezbędne do powstania chromosomu eukariotycznego, zdolnego do replikacji, a następnie segregacji w trakcie mitozy. Każdy chromosom ma wiele miejsc początku replikacji, jeden centromer i dwa telomery. Przedstawiono schematycznie sekwencję zdarzeń, której podlegają chromosomy podczas cyklu komórkowego. DNA ulega replikacji w interfazie. W fazie M centromery łączą podwojone chromosomy z wrzecionem mitotycznym tak, że do obu komórek potomnych trafia po jednej kopii. Centromer pomaga też utrzymać razem podwojone chromosomy, zanim będą gotowe, by się rozdzielić.



Rys. 8-6. Zakończenie syntezy końców chromosomów (telomerów). Jedna z nici dwuniciowej cząsteczki DNA jest replikowana w sposób nieciągły (patrz rozdz. 6). Nić syntetyzowana w sposób nieciągły nazywana jest nicią opóźnioną. (Dla ułatwienia nie przedstawiono na rysunku nici syntetyzowanej w sposób ciągły). Do syntezy nici opóźnionej aparat replikacyjny DNA wymaga matrycowego DNA dłuższego od DNA, który ma zostać skopiowany. W liniowej cząsteczce DNA synteza nici opóźnionej jest zatrzymywana krótko przed zakończeniem matrycy. Jednak enzym telomeraza dodaje serię powtórzeń sekwencji DNA do nici matrycy, dzięki czemu nić opóźniona jest w całości replikowana przez polimerazę DNA, tak jak przedstawiono to na rysunku. U człowieka ta powtórzona sekwencja nukleotydowa to GGGGTTA. Telomeraza zawiera krótki fragment RNA, którego sekwencja jest komplementarna do powtórzonej sekwencji DNA; ten RNA działa jak matryca do syntezy telomerowego DNA

jest tworzona z nieciągłych fragmentów, których synteza rozpoczyna się od startera RNA i jest prowadzona przez oddzielny enzym (patrz rys. 6-20). Jednak na końcach liniowej cząsteczki DNA nie ma miejsca na utworzenie startera RNA w celu rozpoczęcia syntezy DNA. Stąd część sekwencji DNA na końcach liniowej cząsteczki może zostać łatwo utracona za każdym razem, kiedy DNA ulega replikacji.

Dla bakterii rozwiązaniem problemu „replikacji końca" jest chromosom w postaci kolistej cząsteczki DNA. Eukariota przyjęły inne rozwiązanie: na końcach chromosomów znajdują się specjalne sekwencje nukleotydowe, które przyłączają enzym zwany telomerazą. Telomeraza dodaje do końców chromosomów wiele kopii tej samej — telomerowej sekwencji DNA, tworząc w ten sposób matrycę do pełnej replikacji nici opóźnionej (rys. 8-6). Telomery spełniają też dodatkową funkcję: powtórzone sekwencje DNA w telomerach tworzą struktury zabezpieczające DNA przed atakiem występujących w komórce enzymów trawiących DNA, nazywanych nukleazami, które preferencyjnie degradują końce cząsteczek DNA. Skoro poznaliśmy już trzy typy wyspecjalizowanych sekwencji DNA definiujących chromosom, możemy powrócić do pytania: w jaki sposób białka upakowują długie cząsteczki DNA, tak by z łatwością komórki mogły nimi operować?

Pytanie 8-2. Opisz konsekwencje tego, gdyby chromosom eukariotyczny...

A. miał tylko jedno miejsce początku replikacji:
(i) dokładnie w środku chromosomu
(ii) na jednym z końców chromosomu;

B. nie miał jednego lub obu telomerów;

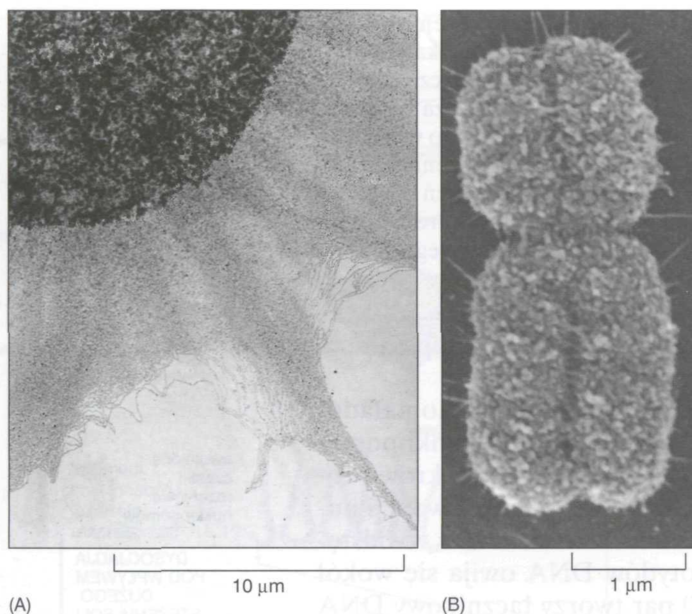
C. nie miał centromeru.

Przyjmij, że typowy chromosom zwierzęcy zawiera 150 milionów par nukleotydów, a replikacja DNA w komórkach zwierzęcych przebiega w tempie 100 nukleotydów na sekundę.

Podstawowymi jednostkami struktury chromatyny są nukleosomy

Jak już poprzednio wspomniano, kompleks DNA i białek tworzących chromosom nazywany jest **chromatyną**. Wiemy, że chromatyna może występować w różnych stanach zależnie od fazy cyklu życiowego komórki. W jądrach interfazowych osiąga stan najbardziej rozproszony, pozwalający na dostęp do DNA enzymów i innych białek koniecznych do ekspresji genów i replikacji DNA (rozdz. 6 i 7). Kiedy chromosomy przygotowują się do wejścia w fazę mitozy, nici chromatyny zwijają się mocniej, przybierając strukturę coraz bardziej zagęszczoną, aż do uformowania silnie skondensowanego chromosomu mitotycznego (rys. 8-7). W chromosomach mitotycznych DNA jest zreplikowany i nie ulega transkrypcji. Jak pokażemy to później, zdolność komórek eukariotycznych do zmiany stopnia upakowania swego DNA jest również wykorzystywana w interfazie jako jeden z mechanizmów kontroli ekspresji genów. Najpierw jednak trzeba szczegółowo dociec, na czym polega upakowanie.

Pierwszy, najbardziej podstawowy poziom upakowania chromatyny — **nukleosom** odkryto w 1974 r. Po delikatnym wypreparowaniu i otwarciu

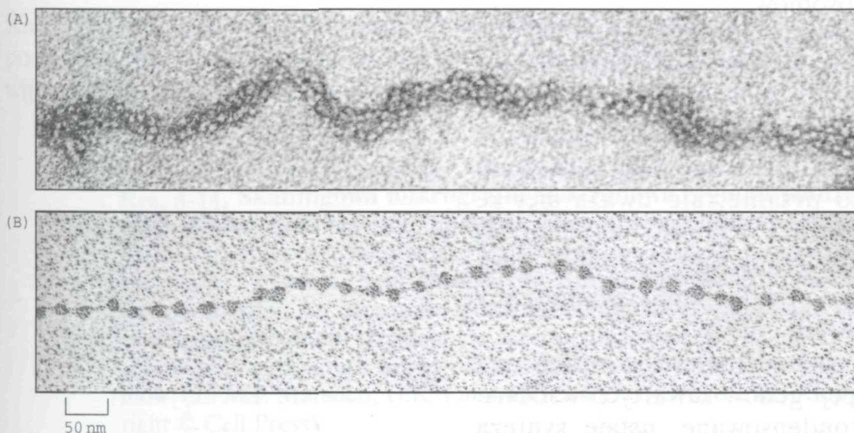


Rys. 8-7. Porównanie interfazowej chromatyny rozproszonej z chromatyną w chromosomie mitotycznym. (A) Mikrografia elektronowa przedstawia rozproszone włókna chromatyny wylewające się z jądra interfazowego poddanego lizie. (B) Zdjęcie z elektronowego mikroskopu skaningowego przedstawiające chromosom mitotyczny. Jest to chromosom podwojony, w którym oba nowe chromosomy nadal są połączone (patrz rys. 8-5). Region przewężenia wskazuje pozycję centromeru. Zauważ różnice w skali obu zdjęć. (Dzięki uprzejmości: A — Victoria Foe; B — Terry D. Allen)

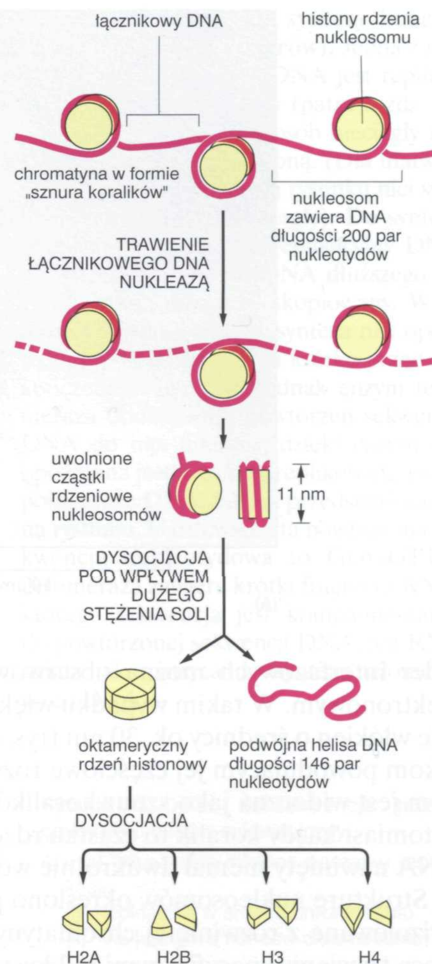
jąder interfazowych można obserwować ich zawartość w mikroskopie elektronowym. W takim wypadku większość chromatyny występuje w formie włókien o średnicy ok. 30 nm (rys. 8-8A). Chromatyna poddana czynnikom powodującym jej częściowe rozwinięcie w mikroskopie elektronowym jest widoczna jako sznur koralików (rys. 8-8B). Sznurem jest DNA, natomiast każdy koralik to cząstka rdzeniowa nukleosomu, która zawiera DNA nawinięty niemal dwukrotnie wokół białek rdzenia.

Strukturę nukleosomów określono po tym, jak zostały po raz pierwszy wyizolowane z rozwiniętej chromatyny. Izolację przeprowadzono za pomocą trawienia specyficznymi nukleazami, które dzielą DNA na odcinki, rozcinając go pomiędzy nukleotydami. Jeśli trawienie prowadzi się przez krótki czas, to ulega degradacji odsłonięty DNA, występujący pomiędzy cząstkami rdzeniowymi nukleosomu — *DNA łącznikowy*. Pojedyncza cząstka rdzenia nukleosomu składa się z kompleksu ośmiu białek **histonowych** — po dwa z każdego rodzaju histonów: H2A, H2B, H3 i H4 — i z dwuniciowego DNA o długości ok. 146 par zasad. Histonowy oktamer tworzy rdzeń białkowy, wokół którego nawinięta jest helisa dwuniciowego DNA (rys. 8-9).

Termin „nukleosom" określa cząstkę rdzeniową nukleosomu wraz z przylegającym do niej łącznikowym DNA. Utworzenie nukleosomów zmienia cząsteczkę DNA w nić chromatyny, która ma w przybliżeniu jed-



Rys. 8-8. Nukleosomy widziane w mikroskopie elektronowym. (A) Chromatyna izolowana bezpośrednio z jądra interfazowego w mikroskopie elektronowym wygląda jak włókno o grubości 30 nm. (B) Mikrografia fragmentu chromatyny zdekondensowanej, którą po izolowaniu „rozpakowano", aby ukazać nukleosomy. (Dzięki uprzejmości: A — Barbara Hamkalo; B — Victoria Foe)



Rys. 8-9. Budowa nukleosomu. Nukleosom zawiera rdzeń białkowy złożony z ośmiu cząsteczek histonów. Jak wskazano, cząstka rdzeniowa nukleosomu uwalnia się z chromatyny po strawieniu łącznikowego DNA nukleazą — enzymem, który rozcina DNA. (Nukleaza może degradować wolny DNA, ale nie może trawić DNA owiniętego wokół nukleosomu). Długość DNA, który był nawinięty wokół rdzenia, można określić po dysocjacji izolowanych nukleosomów na rdzeń białkowy i DNA. Jego długość — 146 par nukleotydów — jest wystarczająca do niemal dwukrotnego owinięcia się wokół rdzenia histonowego

ną trzecią długości początkowej cząsteczki. Jest to pierwszy stopień upakowania DNA.

Histony są małymi białkami, zawierającymi dużo dodatnio naładowanych aminokwasów (lizyny i argininy). Te dodatnie ładunki pomagają histonom ściśle wiązać się z ujemnie naładowanym cukrowo-fosforanowym szkieletem DNA, bez względu na specyfikę sekwencji nukleotydowej. Nukleosomy są rozmieszczone wzdłuż DNA w odstępach ok. 200 par zasad (146 par nukleotydów DNA owija się wokół rdzenia histonowego i przeciętnie ok. 50 par tworzy łącznikowy DNA pomiędzy sąsiadującymi ze sobą rdzeniami nukleosomowymi). Histony występują w ogromnych ilościach (po około 60 milionów cząsteczek w każdym typie komórki), a ich całkowita masa w chromatynie niemal dorównuje masie DNA.

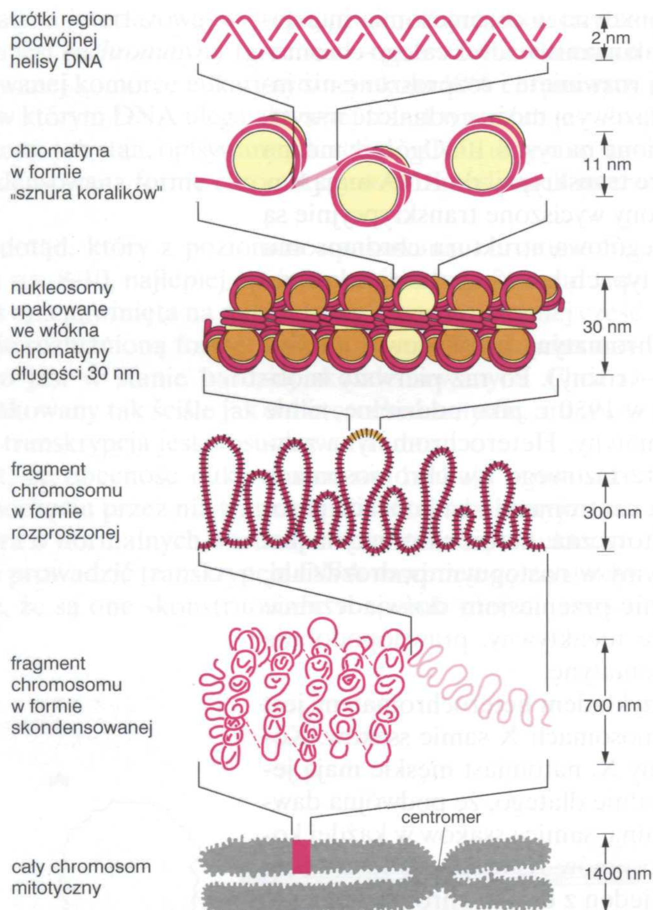
Histony tworzące rdzeń nukleosomu są najbardziej konserwatywne wśród poznanych białek eukariotycznych: na przykład sekwencje aminokwasowe histonu H4 z grochu i wołu różnią się tylko w dwóch miejscach. Ostatnio odkryto histony w archebakteriach, królestwie filogenetycznie odległym od roślin i zwierząt (patrz rozdz. 1 i 13). Ten skrajny konserwatyzm ewolucyjny odzwierciedla zasadniczą rolę strukturalną histonów w tworzeniu chromatyny.

Chromosomy mają kilka poziomów upakowania DNA

W żywych komórkach chromatyna prawdopodobnie rzadko przybiera postać rozwiniętego sznura koralików, widoczną na zdjęciu 8-8B. Zamiast tego nukleosomy są upakowane jeden na drugim, tworząc bardziej zwartą strukturę *włókna o średnicy 30 nm* (solenoid — *przyp. tłum.*; patrz rys. 8-8A). Pakowanie chromosomów we włókna 30 nm zależy od piątego histonu, nazywanego histonem H1, którego zadaniem jest łączenie nukleosomów w zwarty, powtarzający się szyk. Powstającą w wyniku tego strukturę przedstawiono na rys. 8-10, jako część większego schematu, ilustrującego różne poziomy kondensacji chromosomów.

Wiemy, że włókna chromatyny o średnicy 30 nm ulegają dalszej kondensacji. Jak już wcześniej zauważono w tym rozdziale, podczas mitozy chromatyna zostaje tak silnie skondensowana, że chromosomy można oglądać w mikroskopie świetlnym. Jak jest pofałdowane włókno 30 nm tworzące chromosomy mitotyczne? Nie udzielono jeszcze szczegółowej odpowiedzi na to pytanie, ale uważa się, że włókna 30 nm są zwijane w pętle odchodzące od położonej centralnie osi (rys. 8-10 i 8-11). Uważa się, że ten sznur złożony z pętli przechodzi przynajmniej jeszcze jeden poziom upakowania, aby utworzyć chromosom mitotyczny (rys. 8-10).

Ścisłe upakowanie chromatyny, jakie zachodzi w czasie mitozy, ma ważne znaczenie dla procesów transkrypcji genów zawartych w DNA: gdy chromosomy stają się bardziej skondensowane, ustaje synteza

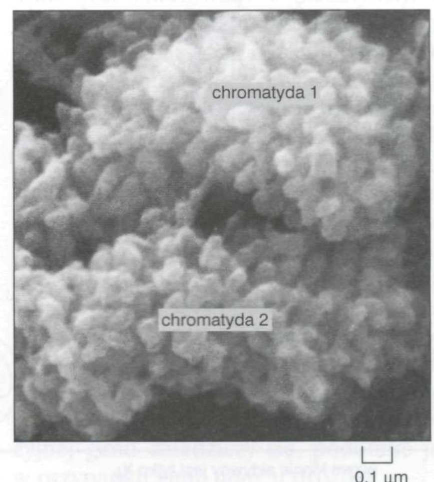


Rys. 8-10. Poziomy upakowania chromatyny. Schemat przedstawia poszczególne stopnie upakowania chromatyny, prowadzące do powstania silnie skondensowanego chromosomu mitotycznego. Najlepiej poznanym poziomem upakowania jest nawinięcie DNA na rdzenie nukleosomów. Struktury odpowiadające dodatkowym warstwom zwinięcia chromosomu oparto raczej na domysłach

RNA, po części dlatego, że DNA staje się tak zwarty, iż polimeraza RNA i inne białka konieczne do transkrypcji nie mają do niego dostępu. W następnej części rozdziału rozważymy, jak można odnieść strukturę chromosomów mitotycznych do struktury chromosomów interfazowych, które mogą ulegać transkrypcji.

Chromosomy interfazowe zawierają zarówno skondensowane jak i rozproszone formy chromatyny

Kiedy komórki potomne zakończą procesy związane z rozdzieleniem się po mitozie, odtwarza się otoczka jądrowa, a chromosomy mitotyczne rozwijają się, przybierając bardziej rozproszoną postać chromosomów inter-

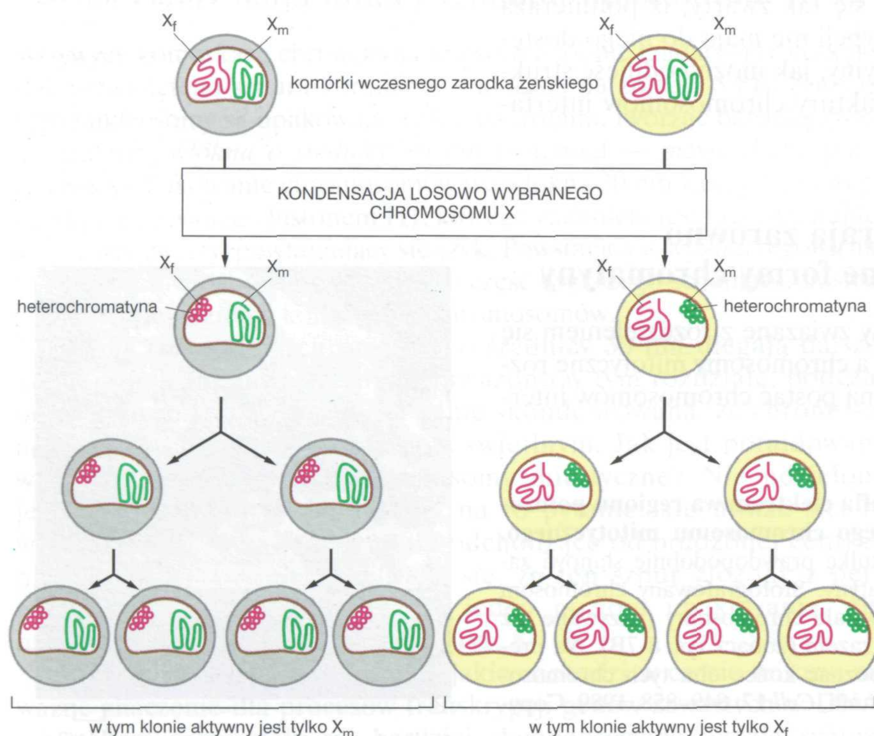


Rys. 8-11. Skaningowa mikrografia elektronowa regionu położonego blisko zakończenia typowego chromosomu mitotycznego. Każda struktura przypominająca kulkę prawdopodobnie stanowi zakończenie oddzielnej pętli chromatyny. Sfotografowany chromosom jest podwojony, ale dwa nowo powstałe chromosomy (nazywane też chromatydami) nadal trzymają się razem (zobacz rys. 8-7B). Na prezentowanej mikrografii łatwo rozpoznać końce obu tych chromosomów. (Z: M.P. Marsden, U.K. Laemmli, *Cell* 17: 849–858, 1989. Copyright © Cell Press)

fazowych (patrz rys. 8-4). Jednakże chromatyna w chromosomie interfazowym nie jest w tym samym stadium upakowania wzdłuż całego chromosomu. Niektóre regiony stają się bardziej rozwinięte i rozproszone niż inne, i wydaje się, że w chromosomie interfazowym można odnaleźć wszystkie stopnie upakowania DNA przedstawione na rys. 8-10. Ogólnie można przyjąć, że regiony chromosomu ulegające transkrypcji do RNA mają formę bardziej rozproszoną, natomiast regiony wyciszone transkrypcyjnie są bardziej skondensowane. Tak więc szczegółowa struktura chromosomu interfazowego jest odmienna w różnych typach komórek, bowiem zależy od tego, jakie geny ulegają ekspresji.

Najbardziej skondensowana forma chromatyny interfazowej nazywa się **heterochromatyną** (grec. heteros — różny). Po raz pierwszy zaobserwowano ją w mikroskopie świetlnym w 1930 r. jako oddzielne, silnie wybarwiające się regiony w masie chromatyny. Heterochromatyna zwykle stanowi około 10% chromosomu interfazowego i w chromosomach ssaków typowo występuje wokół regionu centromeru i na końcach chromosomów. Podobnie jak chromatyna mitotyczna, heterochromatyna jest transkrypcyjnie nieaktywna. Jak zobaczymy w następnym podrozdziale, jeśli gen aktywny transkrypcyjnie zostanie przeniesiony doświadczalnie w region heterochromatyny, to staje się nieaktywny, prawdopodobnie z powodu jego upakowania w heterochromatynę.

Być może najbardziej uderzającym przykładem heterochromatyny jest ta, którą wykryto w interfazowych chromosomach X samic ssaków. Komórki żeńskie zawierają dwa chromosomy X, natomiast męskie mają jeden chromosom X i jeden Y. Przypuszczalnie dlatego, że podwójna dawka produktów chromosomu X byłaby letalna, samice ssaków w każdej komórce trwale inaktywują jeden z chromosomów X: w sposób losowy, na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego, jeden z dwóch chromosomów X w każdej komórce zostaje wysoce skondensowany w heterochromatynę. Od tej chwili taka nieaktywna i silnie skondensowana forma chromosomu X jest dziedziczona przez wszystkie komórki potomne (rys. 8-12).

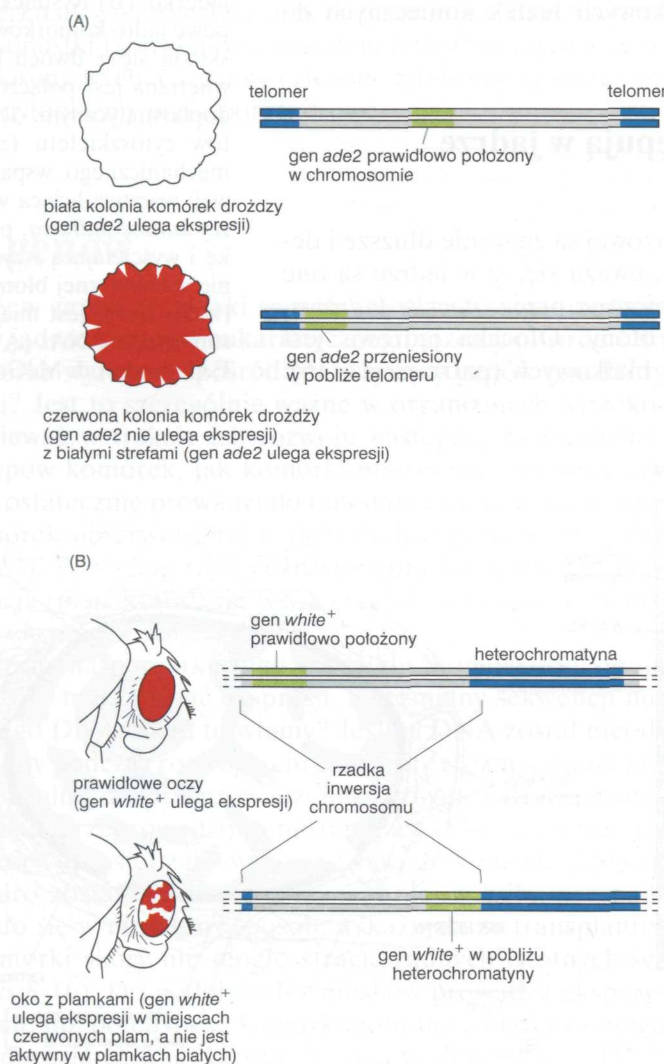


Rys. 8-12. Inaktywacja chromosomu X. Komórki w żeńskim zarodku ssaka zawierają dwa chromosomy X, jeden od matki (X_m) a drugi od ojca (X_f). Na wczesnym etapie rozwoju w każdej komórce jeden z tych dwóch chromosomów, wybrany prawdopodobnie w sposób losowy, zostaje skondensowany w heterochromatynę. Odtąd podczas każdego podziału komórkowego ten sam chromosom pozostaje skondensowany we wszystkich komórkach potomnych. U myszy inaktywacja chromosomu X następuje pomiędzy trzecim a szóstym dniem rozwoju. Również u ludzi inaktywacja następuje wcześnie w trakcie rozwoju, zanim komórki zostaną przydzielone do określonych szlaków rozwojowych. Tak więc samice zbudowane są z mozaiki komórek, zawierających nieaktywny chromosom X od matki albo od ojca. W większości tkanek i organów mniej więcej połowa komórek ma nieaktywny chromosom X matki, a druga połowa — ojca

Pozostała chromatyna interfazowa, występująca w różnych stanach rozproszenia, nazywana jest *euchromatyną* (grec. eu — prawdziwa, właściwa). W typowej zróżnicowanej komórce eukariotycznej około 10% chromatyny występuje w stanie, w którym DNA ulega aktywnej transkrypcji lub jest dostępny dla tego procesu; ten stan, opisywany jako chromatyna aktywna, stanowi najmniej skondensowaną formę chromatyny w chromosomach interfazowych.

Nie wyjaśniono dotąd, który z poziomów upakowania chromosomu, przedstawionych na rys. 8-10, najlepiej opisuje chromatynę aktywną. Jednakże wiemy, że jest ona nawinięta na nukleosomy i że przynajmniej część z niej może stanowić rozluźnioną formę włókien 30 nm. Reszta chromosomu interfazowego jest w stanie bardziej skondensowanym. Chociaż DNA nie jest tu upakowany tak ściśle jak w heterochromatynie, ani trwale nieaktywny, jego transkrypcja jest stosunkowo trudna.

Interesujące jest, że obecność nukleosomu nie blokuje polimerazy RNA zaraz po rozpoczęciu przez nią transkrypcji. Nawet bakteryjna polimeraza RNA, która w normalnych warunkach nie styka się z nukleosomami *in vivo*, może prowadzić transkrypcję DNA nawiniętego na nukleosomy, co sugeruje, że są one skonstruowane w sposób ułatwiający ich



Rys. 8-13. Wpływ pozycji na ekspresję genów. (A) Gdy gen *ade2* z drożdży występuje w prawidłowym położeniu w chromosomie, ulega ekspresji we wszystkich komórkach. Po przeniesieniu w miejsce leżące w pobliżu zakończenia chromosomu, czyli do regionu o szczególnie zwartej formie chromatyny, przestaje ulegać ekspresji w większości komórek należących do populacji. Gen *ade2* koduje jeden z enzymów szlaku biosyntezy adeniny, a brak produktów genu *ade2* prowadzi do akumulacji czerwonego barwnika. Tak więc kolonia komórek, w których *ade2* ulega ekspresji, jest biała. Kolonia, w której gen *ade2* jest nieaktywny, jest czerwona. Biały region wokół czerwonej kolonii stanowią komórki, w których gen *ade2* w sposób spontaniczny odzyskał aktywność. Odzyskanie aktywności genu w tych komórkach mogło nastąpić wskutek dziedzicznej zmiany stanu upakowania chromatyny w pobliżu genu *ade2*.

(B) Wpływ pozycji można też obserwować dla genu *white* muszki owocowej *Drosophila*. Gen *white* kontroluje wytwarzanie barwnika oka, a jego nazwa (ang. white — biały) pochodzi od mutacji, dzięki której został zidentyfikowany. Dziki typ muszek z normalnym genem *white* (*white*$^{+}$) wytwarza barwnik, który powoduje zabarwienie oka na czerwono, ale gdy gen *white* jest zmutowany i nieaktywny, to zmutowane muszki (*white*$^{-}$) nie wytwarzają barwnika i ich oczy są białe. Muszki, u których normalny gen *white*$^{+}$ został przeniesiony blisko regionu heterochromatyny, mają oczy nakrapiane — z białymi i czerwonymi plamkami. Białe plamki stanowią komórki, w których gen *white*$^{+}$ uległ wyciszeniu pod wpływem heterochromatyny, a plamki czerwone odpowiadają komórkom z aktywnym genem *white*$^{+}$. Powodem występowania plamek jest niepełne wyciszenie genu przez wpływ heterochromatyny. Obecność rozległych plamek białych i czerwonych komórek wskazuje, że stan aktywności transkrypcyjnej genu dziedziczy się, podobnie jak w przypadku genu *ade2* u drożdży

przemierzanie. Podobnie dzieje się podczas replikacji, kiedy DNA również występuje w formie nukleosomów (można to zobaczyć na mikrografii elektronowej, przedstawiającej replikujący DNA — rys. 6-14). Dokładnie nie wiemy, co dzieje się w obu tych przypadkach, ale prawdopodobnie w trakcie przechodzenia polimerazy, DNA częściowo odczepia się od rdzenia histonowego nukleosomu. Nukleosom montuje się ponownie po przejściu polimerazy.

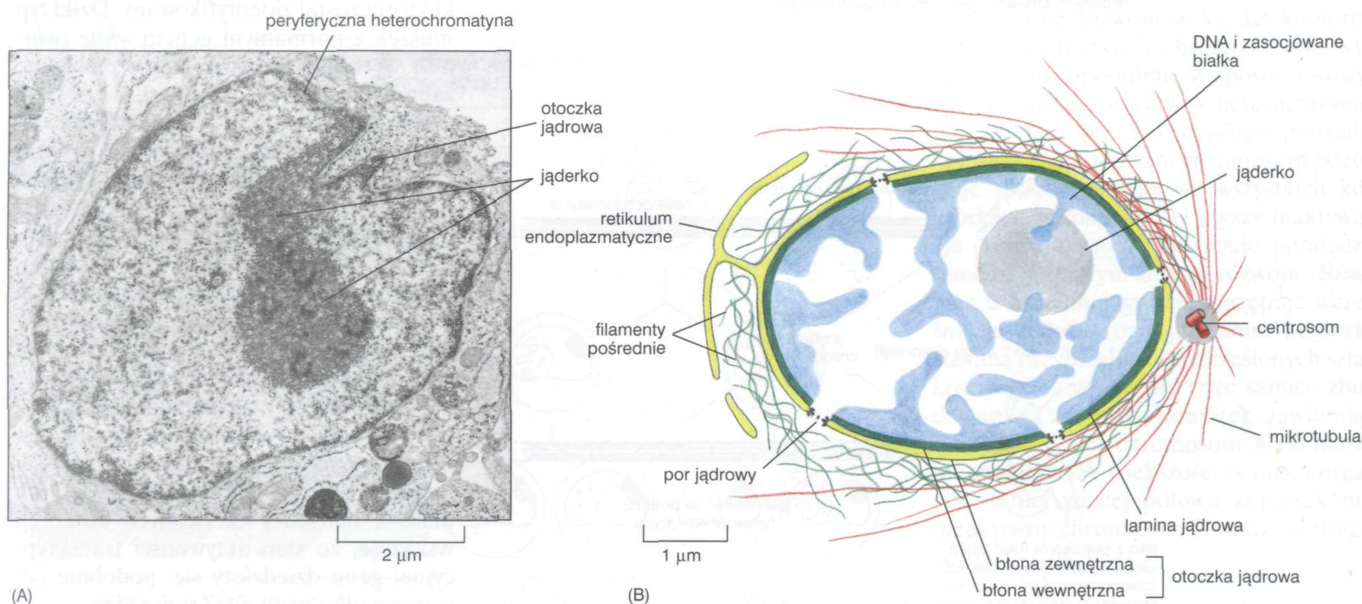
Pytanie 8-3. Mutacje określonego genu na chromosomie X prowadzą do daltonizmu. Wszyscy mężczyźni noszący zmutowany gen są daltonistami. Większość kobiet mających zmutowany gen prawidłowo widzi kolory, ale kolorowe obrazy są dla nich nieostre. Uważa się, że jest to spowodowane rzadszym występowaniem funkcjonujących czopków (komórek mających fotoreceptory koloru) niż w normalnej siatkówce. Czy możesz podać wyjaśnienie tej obserwacji? Jeśli kobieta jest daltonistką, to co możesz powiedzieć o jej ojcu? A o matce? Uzasadnij odpowiedzi.

Wpływ efektu pozycyjnego na ekspresję genów ujawnia różnice w upakowaniu chromosomów interfazowych

Niektóre dowody na to, że chromosomy interfazowe są mieszaniną chromatyny silnie skondensowanej i słabiej upakowanej, pochodzą z doświadczeń, w których zaobserwowano zmianę ekspresji genu po tym, jak zmieniono jego lokalizację na chromosomie. Różnice w ekspresji genu, które zależą od jego umiejscowienia w genomie, określa się mianem **efektu pozycyjnego** i można je zademonstrować u organizmów poddawanym manipulacjom genetycznym w laboratorium, takich jak drożdże piekarniane czy muszka owocowa (rys. 8-13). Dotychczas dobrze nie poznano właściwości chromatyny, które wywołują efekt pozycyjny. Uważa się, że bardziej skondensowane formy chromatyny, takie jak heterochromatyna, mogą rozprzestrzeniać się wzdłuż chromosomów i czynić pobliskie geny niedostępnymi dla polimerazy RNA i dodatkowych białek koniecznych do transkrypcji.

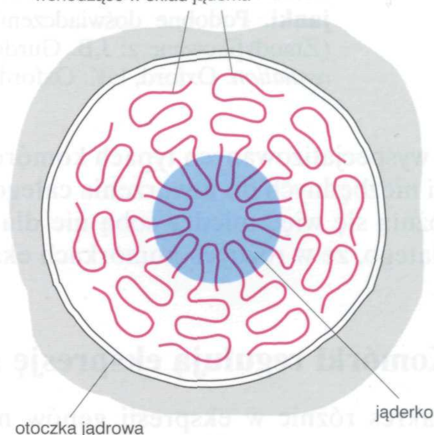
Chromosomy interfazowe występują w jądrze w sposób zorganizowany

Mimo że chromosomy w komórce interfazowej są znacznie dłuższe i delikatniejsze niż chromosomy mitotyczne, uważa się, iż w jądrze są one dobrze zorganizowane. Jądro jest ograniczone przez *otoczkę jądrową*, utworzoną przez dwie koncentryczne błony. Otoczka jądrowa jest wspierana przez dwie siatki filamentów białkowych (patrz rozdz. 16):



Rys. 8-14. Jądro interfazowe. (A) Mikrografia elektronowa ultraskrawka jądra fibroblastu człowieka. Jądro jest okolone otoczką jądrową, zbudowaną z podwójnej błony perforowanej przez pory jądrowe. Zgromadzona wewnątrz jądra chromatyna widoczna jest w postaci rozproszonej, nakrapianej masy; heterochromatyna (wybarwiona na ciemno) występuje głównie peryferycznie, bezpośrednio pod otoczką jądrową. Duży ciemny region to jąderko. (B) Rysunek przekroju przez typowe jądro komórkowe. Otoczka jądrowa składa się z dwóch błon, z których zewnętrzna jest połączona z retikulum endoplazmatycznym. Dwie siatki filamentów cytoszkieletu (*zielone*) dostarczają mechanicznego wsparcia otoczce jądrowej; warstwa leżąca wewnątrz jądra tworzy *laminę jądrową*, przypominającą płytkę i wyścielającą wewnętrzną powierzchnię wewnętrznej błony jądrowej. Jąderko (kolor *szary*) jest miejscem syntezy rybosomowego RNA. (A dzięki uprzejmości E.G. Jordan, J. McGovern)

Rys. 8-15. Jąderko. Ten bardzo schematyczny rysunek jąderka w komórce człowieka pokazuje, że w formowaniu jąderka uczestniczą pętle chromatyny, zawierające geny rRNA, a pochodzące z 10 różnych chromosomów interfazowych (patrz „gałki" na rys. 8-3)



pierwsza, zwana *laminą jądrową*, tworzy cienką warstwę leżącą pod wewnętrzną błoną jądrową i wspiera ją, podczas gdy druga, mniej regularnie zorganizowana, otacza zewnętrzną błonę jądrową (rys. 8-14). Obie błony są w pewnych odstępach „podziurawione" przez pory jądrowe, które aktywnie transportują wybrane cząsteczki z cytoplazmy i do niej. Na przykład mRNA jest eksportowany do cytoplazmy, natomiast białka jądrowe, takie jak histony, są importowane do jądra.

Wnętrze jądra nie jest przypadkową mieszaniną wielu cząsteczek DNA, RNA i białek. Prawdopodobnie każdy chromosom interfazowy zajmuje szczególny region w jądrze i dlatego różne chromosomy nie zaplątują się ze sobą. Taka organizacja jądra utrzymuje się częściowo przez przymocowanie części chromosomów do miejsc w otoczce jądrowej lub w laminie.

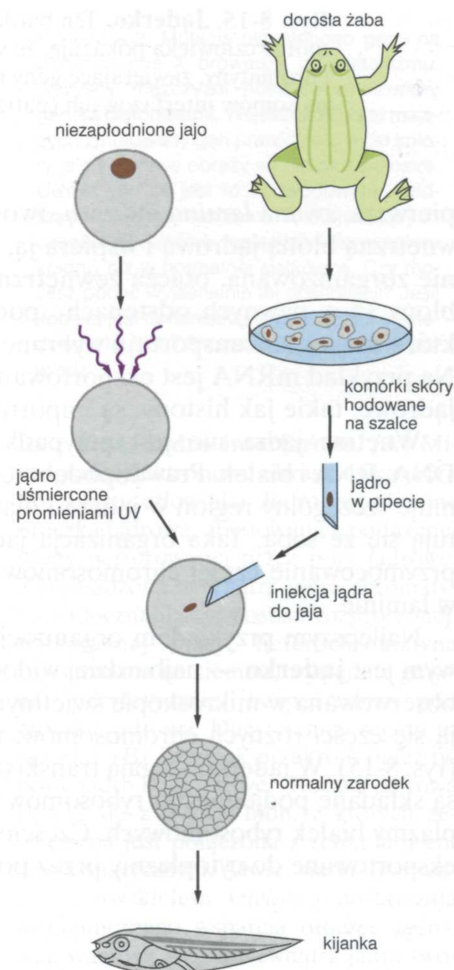
Najlepszym przykładem organizacji chromosomu w jądrze interfazowym jest **jąderko** — najbardziej widoczna struktura jądra interfazowego obserwowana w mikroskopie świetlnym. Jest to region, w którym skupiają się części różnych chromosomów, niosące geny rybosomowych RNA (rys. 8-15). W jąderku ulegają transkrypcji geny rybosomowych RNA oraz są składane podjednostki rybosomów z udziałem importowanych z cytoplazmy białek rybosomowych. Częściowo złożone rybosomy są następnie eksportowane do cytoplazmy przez pory jądrowe.

Regulacja genów

Skoro poznaliśmy w zarysach, w jaki sposób DNA jest zorganizowany w chromosomy w jądrze komórki eukariotycznej, możemy powrócić do pytania: jak komórka wyróżnia spośród wielu tysięcy genów ten, który ma ulec ekspresji? Jest to szczególnie ważne w organizmach wielokomórkowych, ponieważ w trakcie ich rozwoju następuje różnicowanie się rozmaitych typów komórek, jak komórki mięśniowe, nerwowe czy komórki krwi, co ostatecznie prowadzi do powstania wielkiej różnorodności typów komórek obserwowanej w dorosłych organizmach (patrz panel 1-3, s. 32–33). Powodem tego **różnicowania** komórek jest produkcja i akumulacja różnego rodzaju RNA i białek; a to znaczy, że dochodzi w nich do ekspresji różnych genów.

Jak podkreśliliśmy na początku tego rozdziału, komórki dokonują wyboru genów, które mają ulegać ekspresji, bez zmiany sekwencji nukleotydowej samego DNA. Skąd to wiemy? Jeśliby DNA został nieodwracalnie zmieniony podczas rozwoju, chromosomy zróżnicowanej komórki byłyby niezdolne do przeprowadzenia rozwoju całego organizmu. Aby to zbadać, przeprowadzono następujące doświadczenie: jądro z komórki skóry dorosłej żaby wprowadzono do komórki jajowej, której własne jądro zostało usunięte. Przynajmniej w kilku przypadkach jajo rozwijało się w normalny sposób, wskazując, że transplantowane jądro z komórki skóry nie mogło stracić żadnych istotnych sekwencji DNA (rys 8-16). Do podobnych wniosków prowadzą eksperymenty na roślinach: np. pojedyncze komórki pobrane z marchwi mogą zregenerować w dorosłą roślinę. Doświadczenia te dowodzą, że DNA

Rys. 8-16. **Jądro zróżnicowanej komórki skóry dorosłej żaby zawiera zakodowane w DNA wszystkie instrukcje do utworzenia kijanki.** Podobne doświadczenie przeprowadzono ostatnio na owcy. (Zmodyfikowane z: J.B. Gurdon, *Gene Expression During Cell Differentiation.* Oxford, UK: Oxford University Press, 1973)



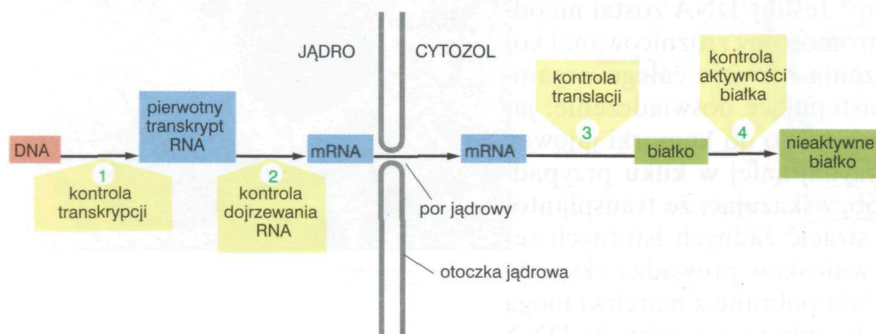
w wyspecjalizowanych typach komórek nadal ma pełen zestaw instrukcji niezbędnych do utworzenia całego organizmu. Komórki organizmu różnią się więc między sobą nie dlatego, że zawierają inne geny, ale dlatego, że w różnych komórkach ekspresji ulega różny zestaw genów.

Komórki regulują ekspresję swoich genów

Zakres różnic w ekspresji genów między różnymi typami komórek można z grubsza określić przez porównanie składu białek w wątrobie, sercu, mózgu lub innych tkankach za pomocą techniki elektroforezy dwukierunkowej (patrz panel 5-5, s. 162–163). Doświadczenia tego typu ujawniają, że wiele białek jest wspólnych dla wszystkich komórek organizmu wielokomórkowego. Należą do nich główne białka strukturalne cytoszkieletu i chromosomów, białka niezbędne do budowy błon retikulum i aparatu Golgiego, białka rybosomowe oraz enzymy przeprowadzające glikolizę i inne podstawowe procesy metaboliczne; wszystkie te białka uniwersalne są niezbędne do utrzymania metabolizmu komórkowego i są określane angielskim terminem *housekeeping proteins* (białka dbające o utrzymanie domu), kodujące je geny — *housekeeping genes*. Każdy odrębny typ komórek wytwarza również specyficzne białka, które są odpowiedzialne za wyróżniające cechy komórki. U ssaków na przykład hemoglobina powstaje wyłącznie w retikulocytach, komórkach rozwijających się w czerwone krwinki, i nie można jej wykryć w żadnym innym typie komórek.

W rzeczywistości większość białek komórkowych tworzy się w tak małych ilościach, że nie można ich wykryć za pomocą techniki elektroforezy. Można natomiast wykryć nawet minimalne ilości kodujących je mRNA, stosując znacznie czulsze techniki (patrz rozdz. 10). Z szacunkowych obliczeń ilości różnych sekwencji mRNA w komórce wynika, że typowa zróżnicowana komórka ssaka może syntetyzować 10000 różnych białek z repertuaru około 60000 genów. To właśnie ekspresja różnego typu kolekcji genów w każdym typie komórek powoduje powstawanie różnic wielkości, pokroju, zachowania i funkcji zróżnicowanych komórek.

W jaki sposób przebiega kontrola ekspresji genów? Dowiedzieliśmy się w rozdz. 7, że istnieje wiele kroków na drodze prowadzącej od DNA do białka i że wszystkie z nich mogą w zasadzie podlegać regulacji. Tak więc komórka może regulować wytwarzanie białek poprzez: 1) kontrolo-



Rys. 8-17. **Cztery etapy, na których może zachodzić kontrola ekspresji genów eukariotycznych.** Znane są przykłady regulacji genów na każdym z tych etapów, choć większość genów podlega kontroli na pierwszym etapie: transkrypcji DNA na RNA

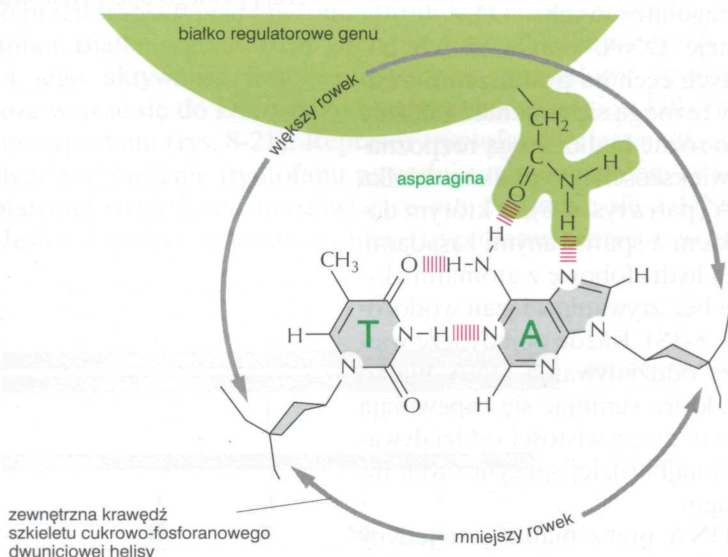
wanie, kiedy i jak często dany gen ulega transkrypcji, 2) kontrolowanie procesów składania (splicing) i dojrzewania (processing) pierwotnego transkryptu RNA, 3) selekcjonowanie mRNA i decydowanie, który z nich ma ulegać translacji na rybosomach, 4) wybiórczą aktywację lub inaktywację białek po tym, jak już zostały wytworzone (rys. 8-17).

Chociaż znane są przykłady regulacji na każdym etapie przedstawionym na rys. 8-17, najważniejsza kontrola większości genów odbywa się na poziomie transkrypcji (etap numer 1). Jest to słuszne, ponieważ tylko kontrola na tym poziomie zapobiega syntezie zbytecznych produktów pośrednich. Dlatego też w pozostałej części tego rozdziału skoncentrujemy się na komponentach DNA i białkach, które określają jakie geny komórka transkrybuje na mRNA.

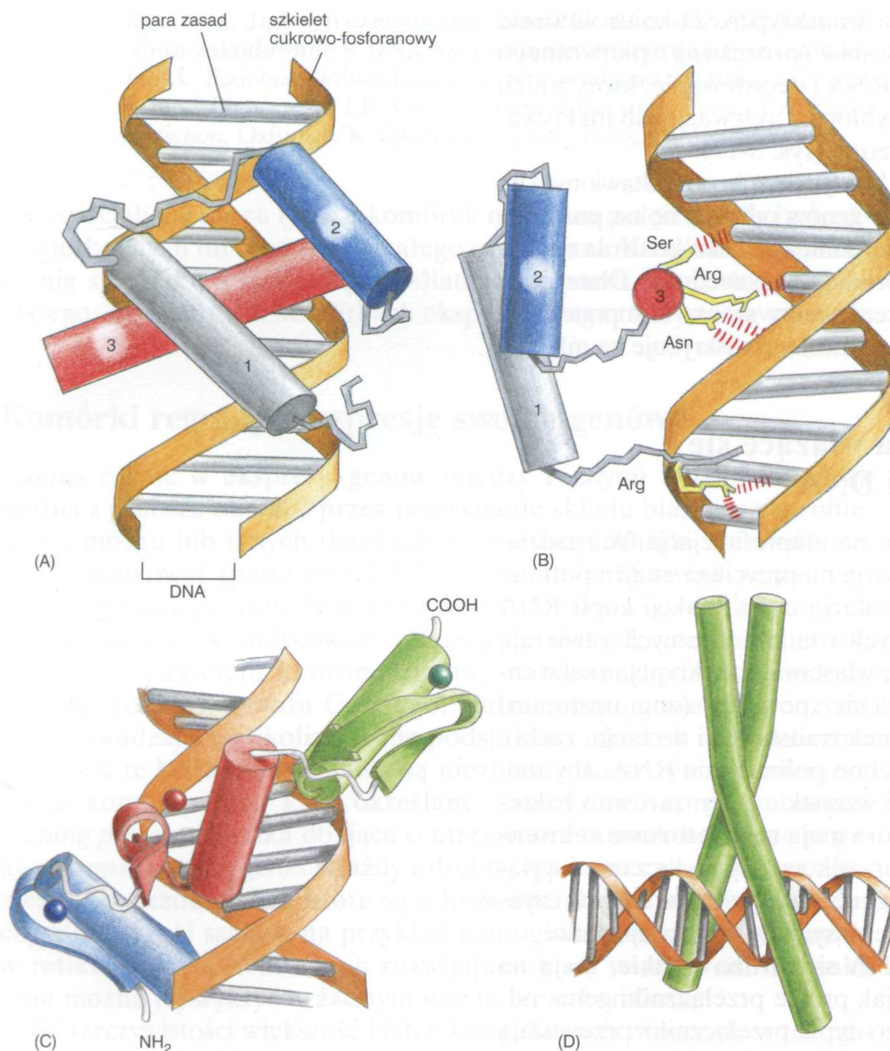
Transkrypcję kontrolują białka wiążące się z sekwencjami regulatorowymi DNA

Kontrola transkrypcji zwykle odbywa się na etapie inicjacji. W rozdziale 7 zobaczyliśmy, że region promotorowy genu przyciąga enzym polimerazę RNA i nadaje jej odpowiednią orientację do produkcji kopii RNA tego genu. Promotory genów bakteryjnych i eukariotycznych zawierają miejsce inicjacji, w którym rozpoczyna się właściwa transkrypcja i sekwencję około 50 nukleotydów, która rozciąga się „powyżej" (ang. upstream) miejsca inicjacji (jeśli porówna się kierunek transkrypcji do biegu rzeki). W regionie tym występują miejsca potrzebne polimerazie RNA, aby mogła przyłączyć się do promotora. Niemal wszystkie geny, zarówno bakteryjne jak i eukariotyczne, oprócz promotora mają **regulatorowe sekwencje DNA**, które są niezbędne do ich uporządkowanego włączania i wyłączania. To, czy gen ulega ekspresji, czy też nie, zależy od rozmaitych czynników, jak typ komórki, jej otoczenie, wiek i sygnały pozakomórkowe.

Niektóre sekwencje regulatorowe DNA są bardzo krótkie, mają na przykład 10 par nukleotydów, i działają jak proste przełączniki genu, odpowiadające na pojedynczy sygnał. Tego typu przełączniki przeważają u bakterii. Inne sekwencje regulatorowe DNA, szczególnie eukariotyczne, są bardzo długie (czasem mają więcej niż 10000 par zasad) i działają jak mikroprocesory, odpowiadając na wiele sygnałów, które w sumie stanowią instrukcję określającą szybkość inicjacji transkrypcji.



Rys. 8-18. Wiązanie się białka regulatorowego z DNA. Przedstawiono tylko jedno połączenie pomiędzy białkiem a jedną parą zasad w DNA. Zwykle powierzchnia oddziaływania białko–DNA składa się z 10 do 20 wiązań niekowalencyjnych, z których każde angażuje inny aminokwas i każde przyczynia się do siły interakcji białko–DNA



Rys. 8-19. Białkowe motywy wiążące DNA. (A i B) Widok z przodu i z boku na *homeodomenę* — motyw strukturalny występujący w wielu białkach wiążących DNA. Składa się ona z trzech połączonych α helis, które na rysunku przedstawiono w kształcie *cylindrów*. Większość oddziaływań z zasadami DNA jest tworzona przez helisę 3 [na rysunku (B) widać jej koniec]. Występująca w tej helisie asparagina (Asn) kontaktuje się z adeniną w sposób przedstawiony na rys. 8-18. (C) Motyw *palca cynkowego* zbudowany jest z α helisy i spinki β (przedstawionej jako *skręcona strzałka*), złączonych atomem cynku (przedstawionym jako *kulka*). Palce cynkowe często występują w grupach, gdzie są kowalencyjnie połączone w sposób pozwalający helisie każdego palca oddziaływać z zasadami DNA w miejscu większego rowka. Na rysunku przedstawiono grupę trzech palców cynkowych. (D) Motyw *suwaka* (*zamka*) *leucynowego*. Ten motyw składa się z dwóch α helis, z których każda pochodzi od innej cząsteczki białka. Białka suwaka leucynowego wiążą się z DNA w postaci dimerów, przyczepiając się do dwóch sąsiadujących ze sobą sekwencji DNA, podobnie jak suwak w zamku błyskawicznym.

Te trzy motywy znajduje się w białkach regulatorowych genów prawie u wszystkich organizmów eukariotycznych. Są one odpowiedzialne za kontrolowanie ekspresji tysięcy różnych genów. Każdy motyw w wielu miejscach oddziałuje z DNA. Dla uproszczenia, na rysunku (B) przedstawiono jedynie wiązania wodorowe, natomiast na rysunkach (C) i (D) nie zaznaczono żadnych wiązań między białkiem i DNA. Nazwy „homeodomena", „palec cynkowy" i „suwak leucynowy" są głównie określeniami historycznymi i nie oznaczają pełnego opisu tych struktur

Sekwencje regulatorowe DNA nie mogą działać samodzielnie. Aby zadziałały, muszą zostać rozpoznane przez **białka regulatorowe** genów, wiążące się z DNA. Kombinacja sekwencji DNA i współdziałających z nimi cząsteczek białkowych działa jak swoisty przełącznik kontrolujący transkrypcję. Poznano setki sekwencji regulatorowych DNA, a każdą z nich rozpoznaje jedno lub więcej białek regulatorowych.

Białka rozpoznają specyficzne sekwencje DNA, ponieważ ich powierzchnia dopasowuje się ściśle do swoistych cech na powierzchni dwuniciowej helisy DNA w tym regionie. Cechy te mogą się zmieniać zależnie od sekwencji nukleotydowej DNA i dlatego różne białka mogą rozpoznawać różne sekwencje nukleotydowe. W większości przypadków białka wnikają do większego rowka w helisie DNA (patrz rys. 6-6), w którym dochodzi do licznych kontaktów między białkiem a sparowanymi zasadami. Białka tworzą wiązania wodorowe, jonowe i hydrofobowe z atomami eksponowanymi na krawędziach zasad, zwykle bez zrywania wiązań wodorowych, które utrzymują zasady w parach (rys. 8-18). Każde pojedyncze wiązanie tego typu jest słabe, ale na obszarze oddziaływania DNA–białko zwykle tworzy się ok. 20 wiązań tego typu, które sumując się zapewniają dużą specyficzność i trwałość oddziaływań; w rzeczywistości oddziaływania DNA–białko należą do najsilniejszych i najbardziej specyficznych interakcji cząsteczkowych poznanych w biologii.

Chociaż każdy przykład rozpoznania DNA przez białko jest jedyny w swoim rodzaju, wiele białek odpowiedzialnych za regulację genów za-

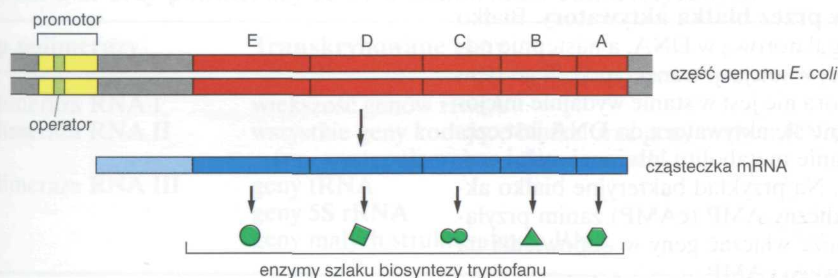
wiera jeden lub kilka stałych motywów pofałdowania cząsteczki. Dopasowują się one do większego rowka dwuniciowej helisy DNA i tworzą mocne połączenie z krótkim odcinkiem sparowanych zasad DNA. Na rysunku 8-19 przedstawiono strukturę niektórych *motywów wiążących DNA*. W każdym przykładzie struktura helisy białka kontaktuje się z większym rowkiem DNA. Często białka wiążące DNA tworzą pary i w postaci dimerów łączą się z helisą DNA. Z grubsza rzecz biorąc dimeryzacja podwaja obszar kontaktowania się z DNA, tym samym zwiększa siłę i specyficzność oddziaływania białka z DNA. Ponieważ w pary mogą się łączyć dwa różne białka, dimeryzacja umożliwia rozpoznawanie wielu różnych sekwencji DNA przez ograniczoną liczbę białek.

Pytanie 8-4. Wyjaśnij, jak białka wiążące DNA mogą tworzyć wiązania ze specyficznymi sekwencjami dwuniciowej cząsteczki DNA bez zrywania wiązań wodorowych, utrzymujących zasady w parach. Wskaż, w jaki sposób poprzez tworzenie tych połączeń białko może odróżnić parę A·T od G·C. Udziel odpowiedzi w podobnej formie jak na rys. 8-18 i wskaż, jaki rodzaj wiązań niekowalencyjnych (wiązania wodorowe, jonowe czy oddziaływania hydrofobowe; patrz panel 2-1, s. 46–47) może się tu tworzyć. Nie ma konieczności określania poszczególnych aminokwasów w białku. Struktury wszystkich par zasad w DNA podano na rys. 6-5.

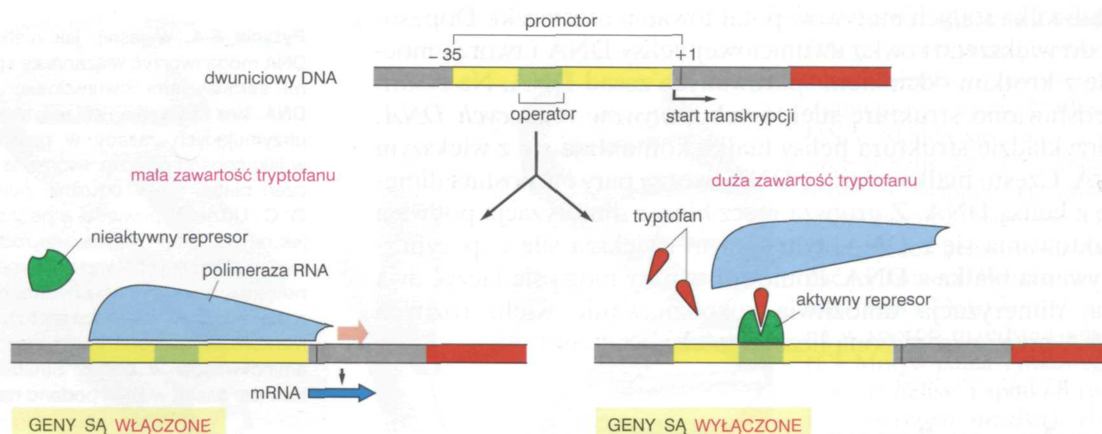
Geny są „wyłączane" przez represory a „włączane" przez aktywatory

Najprostszy i najlepiej poznany sposób regulacji genów występuje u bakterii i ich wirusów. Genom bakterii *E. coli* składa się z pojedynczej kolistej cząsteczki DNA o wielkości ok. $4{,}6 \cdot 10^6$ par nukleotydów. Ten DNA koduje około 4000 białek, chociaż tylko część z nich jest produkowana w tym samym czasie. *E. coli* reguluje ekspresję wielu swoich genów w zależności od źródła pożywienia, jakie jest dostępne w środowisku. Na przykład pięć genów *E. coli*, skupionych w jednym miejscu na chromosomie, koduje enzymy szlaku metabolicznego syntezy aminokwasu tryptofanu. W wyniku transkrypcji od wspólnego promotora powstaje jedna, długa cząsteczka mRNA, a produktem jej translacji jest pięć białek (rys. 8-20). Zgromadzone w ten sposób geny, których transkrypcja daje pojedynczą cząsteczkę mRNA, nazywa się *operonem*. Operony występują powszechnie u bakterii, ale nie znaleziono ich u eukariotów, gdzie geny muszą być regulowane w sposób indywidualny. Jeśli tryptofan występuje w otoczeniu i wnika do komórki bakterii, enzymy do jego syntezy nie są już potrzebne i przestają być wytwarzane. Taka sytuacja może zachodzić na przykład, gdy bakteria jest w jelicie ssaka, który spożył właśnie białkowy posiłek.

Obecnie wiadomo już dość szczegółowo, jak funkcjonuje ten sposób przełączania genów. W obrębie promotora występuje krótka sekwencja DNA (o długości 15 nukleotydów) rozpoznawana przez białko regulatorowe genu. Kiedy białko wiąże się do tej sekwencji nukleotydowej, nazywanej *operatorem*, blokuje dostęp do promotora polimerazie RNA; zabezpiecza to przed transkrypcją operonu i produkcją enzymów syntetyzujących tryptofan. Białko regulatorowe genu jest znane jako represor tryptofanowy, a jego aktywność jest regulowana w pomysłowy sposób: represor może wiązać się do DNA tylko wtedy, jeśli zwiąże się z kilkoma cząsteczkami tryptofanu (rys. 8-21). Represor tryptofanowy jest białkiem allosterycznym: przyłączenie tryptofanu powoduje subtelne zmiany w jego trójwymiarowej strukturze, umożliwiające mu związanie się z DNA operatora. Jeśli w komórce jest mało wolnego tryptofanu, represor go nie



Rys. 8-20. Zespół genów bakteryjnych transkrybowanych od pojedynczego promotora. Każdy z tych pięciu genów koduje inny enzym, ale każdy z nich jest niezbędny do syntezy aminokwasu tryptofanu. Ulegają one transkrypcji do pojedynczej cząsteczki mRNA, dzięki czemu ich ekspresja może być skoordynowana. Zespoły genów, których produktem transkrypcji jest jedna cząsteczka mRNA, występują powszechnie u bakterii. Każdy taki zespół nazywa się *operonem*; ekspresję przedstawionego tu operonu tryptofanowego kontroluje sekwencja regulatorowa nazywana *operatorem*, usytuowana wewnątrz promotora

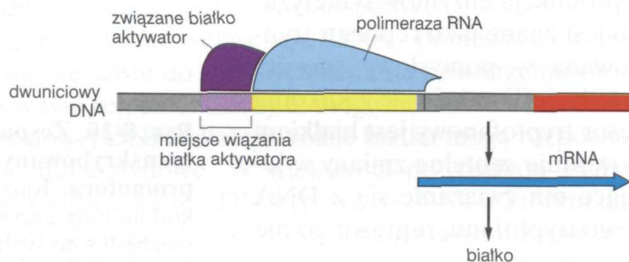


Rys. 8-21. Włączanie i wyłączanie genów za pomocą białka represorowego. Jeśli w komórce jest mało tryptofanu, to represor tryptofanowy nie przyłącza tryptofanu, przez co nie może się wiązać ze swoim regionem kontrolnym — operatorem (kolor *zielony*), który jest położony wewnątrz promotora (*żółty*). Polimeraza RNA może więc przyłączyć się do promotora i dokonywać transkrypcji pięciu genów operonu tryptofanowego (*po lewej*). Jeśli tryptofanu jest dużo, represor wiąże tryptofan i w tym stanie może przyłączyć się do operatora, blokując wiązanie się polimerazy RNA do promotora (*po prawej*). Kiedy zawartość tryptofanu w komórce maleje, represor uwalnia tryptofan i odłączając się od DNA pozwala polimerazie rozpocząć transkrypcję operonu (patrz też rys. 8-20)

przyłącza i dłużej już nie wiąże się z DNA. Następnie operon tryptofanowy ulega transkrypcji. Represor jest więc prostym narzędziem, które włącza i wyłącza produkcję grupy enzymów biosyntetyzujących, zgodnie z zapotrzebowaniem na końcowy produkt szlaku enzymatycznego, który katalizują.

Bakteria może szybko odpowiedzieć na wzrost zawartości tryptofanu, ponieważ białko represora tryptofanowego zawsze znajduje się w komórce. Transkrypcja genu, który je koduje, zachodzi stale na niskim poziomie, tak że zawsze jest wytwarzana niewielka ilość białka represorowego. Taką nieregulowaną ekspresję genu określa się jako *konstytutywną* ekspresję genu.

Represor tryptofanowy, jak sama nazwa wskazuje, to białkowy **represor**, który wyłącza geny przez *hamowanie* transkrypcji. Inne bakteryjne białka regulatorowe genów działają w odwrotny sposób, poprzez włączanie genów, czyli *aktywowanie* ich. Białka **aktywatory** oddziałują z promotorami, które — w przeciwieństwie do promotora z operatorem tryptofanowym — same wykazują jedynie nieznaczną funkcjonalność w przyłączaniu polimerazy RNA; na przykład mogą być słabo rozpoznawane przez polimerazę. Jednakże te słabo działające promotory stają się w pełni funkcjonalne dzięki białkom, które mogą się przyłączać do pobliskiego miejsca na DNA i oddziaływać z polimerazą RNA ułatwiając jej rozpoczęcie transkrypcji (rys. 8-22).



Rys. 8-22. Kontrolowanie genów przez białka aktywatory. Białko aktywator wiąże się z sekwencją regulatorową w DNA, a następnie oddziałuje z polimerazą, pomagając jej w inicjacji transkrypcji. Tego typu promotor (kolor *żółty*) bez aktywatora nie jest w stanie wydajnie inicjować transkrypcji. U bakterii wiązanie się aktywatora do DNA jest często kontrolowane przez oddziaływanie metabolitu lub innej małej cząsteczki z białkiem aktywatorowym. Na przykład bakteryjne białko aktywatorowe CAP musi związać cykliczny AMP (cAMP) zanim przyłączy się do DNA; tak więc CAP może włączać geny w odpowiedzi na wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP

Na zdolność aktywatora do wiązania się z DNA, podobnie jak represora, ma wpływ jego połączenie się z drugą cząsteczką. Na przykład bakteryjny aktywator CAP musi związać cykliczny AMP zanim przyłączy się do DNA. Geny aktywowane przez CAP są włączane w odpowiedzi na wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP, co jest sygnałem dla bakterii, że glukoza, preferowane przez nią źródło węgla, nie jest już dostępna; w rezultacie prowadzi to do wytwarzania enzymów zdolnych do degradacji innych cukrów.

Inicjacja transkrypcji genów eukariotycznych jest procesem złożonym

Genetyczne przełączniki występujące u bakterii są wymownymi przykładami oszczędności i uproszczeń, często obserwowanych w biologii. Jednak u eukariotów typowy gen odpowiada na wiele różnych sygnałów i jego regulacja jest w rezultacie bardziej złożona.

Istnieją cztery istotne różnice między inicjacją transkrypcji u eukariotów i bakterii.

1. Pierwsza różnica tkwi w samej polimerazie RNA. Podczas gdy bakterie dysponują jednym typem polimerazy RNA, komórki eukariotyczne mają ich trzy — *polimerazę RNA I*, *polimerazę RNA II* i *polimerazę RNA III*. Polimerazy te są odpowiedzialne za transkrypcję różnych typów genów. Polimerazy RNA I i III dokonują tanskrypcji genów kodujących rybosomowe, transportujące i małe RNA, które odgrywają w komórce rolę strukturalną (tab. 8-1). Polimeraza RNA II transkrybuje ogromną większość genów eukariotycznych, w tym wszystkie geny kodujące białka i większość snRNA. Nasze dalsze rozważania skupią się na tym enzymie.
2. Druga różnica polega na tym, że bakteryjna polimeraza RNA może inicjować transkrypcję bez pomocy dodatkowych białek, jak to widzieliśmy w przypadku operonu tryptofanowego (rys. 8-21), natomiast eukariotyczne polimerazy RNA same nie mogą rozpoczynać transkrypcji. Potrzebują one współdziałania dużej grupy białek, nazywanych *ogólnymi czynnikami transkrypcyjnymi*, które przed rozpoczęciem transkrypcji muszą w miejscu promotorowym utworzyć kompleks z polimerazą.
3. Trzecią cechą wyróżniającą regulację transkrypcji u eukariotów jest to, że białka regulatorowe genów (represory i aktywatory) mogą wpływać na inicjację transkrypcji nawet wtedy, gdy są związane z DNA leżącym w odległości tysięcy par zasad od promotora. Pozwala to kontrolować pojedynczy promotor niemal nieograniczonej liczbie sekwencji regulatorowych rozrzuconych wzdłuż DNA. U bakterii, przeciwnie, geny są często kontrolowane przez jedną sekwencję regulatorową, zwykle położoną niedaleko promotora (patrz rys. 8-21 i 8-22).

Tabela 8-1. Trzy polimerazy RNA w komórkach eukariotycznych

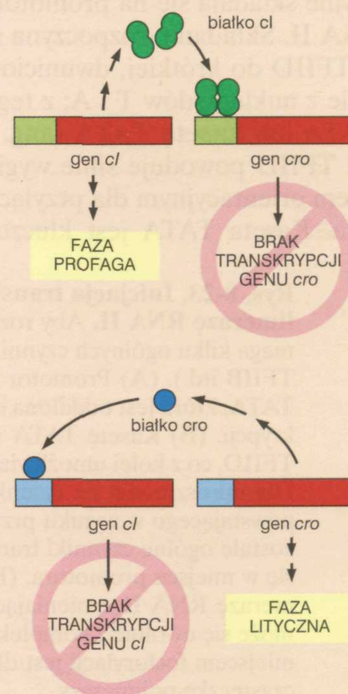
Typ polimerazy	Transkrybowane geny
Polimeraza RNA I	większość genów rRNA
Polimeraza RNA II	wszystkie geny kodujące białka oraz geny małych RNA (np. występujących w spliceosomach)
Polimeraza RNA III	geny tRNA geny 5S rRNA geny małych strukturalnych RNA

Pytanie 8-5. Wirus, który rozwija się w bakteriach (wirusy bakteryjne nazywa się bakteriofagami) może replikować się dwoma sposobami. W fazie profaga wirusowy DNA jest włączony do chromosomu bakteryjnego i kopiowany razem z genomem bakteryjnym, wraz z którym przechodzi z pokolenia na pokolenie. W fazie litycznej wirusowy DNA zostaje uwolniony z chromosomu bakteryjnego i replikuje się wiele razy w komórce. Ten DNA wytwarza następnie białka kapsydu wirusa, które razem ze zreplikowanymi wirusowymi DNA tworzą wiele nowych cząstek wirusowych. Nowe cząstki wirusa niszczą komórkę bakterii i wydostają się na zewnątrz. Te dwie stałe fazy rozwoju są kontrolowane przez dwa białka regulatorowe, nazywane cl („c jeden") i cro, kodowane przez wirusa. W fazie profaga ekspresji ulega cl, natomiast w fazie litycznej tworzy się cro. Poza regulowaniem ekspresji innych genów, cl jest represorem transkrypcji genu kodującego cro, a cro jest represorem genu kodującego cl (rys. P8-5). Kiedy bakterie, zawierające faga w fazie profaga zostaną krótko naświetlone światłem UV, białko cl ulega degradacji.

A. Co się następnie dzieje?

B. Czy zmiana wywołana w (A) może zostać cofnięta, jeśli światło UV zostanie wyłączone?

C. W wyniku czego mógł się rozwinąć taki mechanizm?



Rys. P8-5

4. Ostatnia, istotna różnica polega na tym, że inicjacja transkrypcji u eukariotów musi uwzględniać nawinięcie DNA na nukleosomy i bardziej zwarte formy struktury chromatyny.

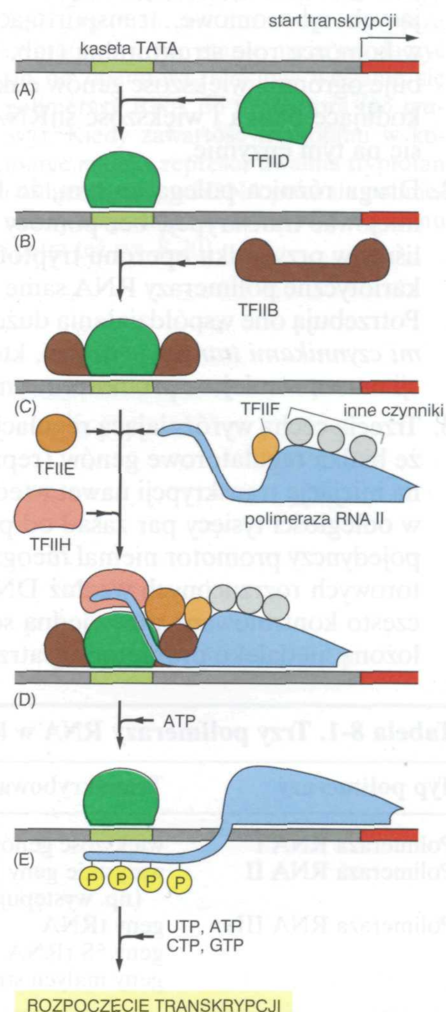
Kolejno rozpatrzymy trzy ostatnie cechy regulacji genów eukariotycznych.

Eukariotyczna polimeraza RNA potrzebuje ogólnych czynników transkrypcyjnych

Początkowe wyniki badań wskazujące, że — w odróżnieniu od bakteryjnej polimerazy RNA — oczyszczona eukariotyczna polimeraza RNA nie jest w stanie zainicjować transkrypcji *in vitro*, legły u podstaw odkrycia i wyizolowania **ogólnych czynników transkrypcyjnych**, koniecznych do przeprowadzenia tego procesu. Ogólne czynniki transkrypcyjne mają za zadanie prawidłowe usytuowanie polimerazy RNA na promotorze, wspomagają rozdzielenie dwóch nici DNA, aby umożliwić rozpoczęcie transkrypcji, i uwolnienie polimerazy RNA z promotora, kiedy transkrypcja się rozpoczyna.

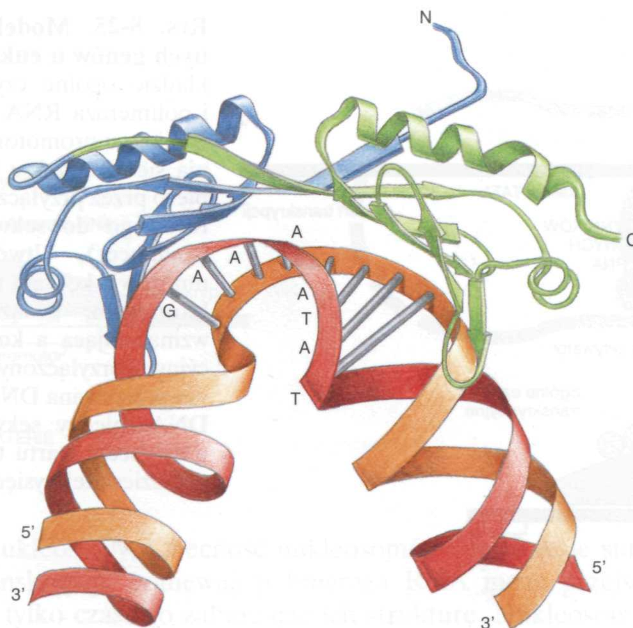
Czynniki określane są mianem „ogólne", ponieważ białka te tworzą kompleksy na wszystkich promotorach transkrybowanych przez polimerazę RNA II. Jest to cecha odróżniająca je od aktywatorów i represorów, które — jak opisaliśmy to u bakterii — regulują jedynie określone geny lub operony, oraz od eukariotycznych regulatorów genów, również działających na poszczególne geny, co przedyskutujemy poniżej.

Na rysunku 8-23 przedstawiono, w jaki sposób ogólne czynniki transkrypcyjne składają się na promotorze wykorzystywanym przez polimerazę RNA II. Składanie rozpoczyna się związaniem czynnika transkrypcyjnego TFIID do krótkiej, dwuniciowej helisy DNA o sekwencji złożonej głównie z nukleotydów T i A; z tego powodu opisuje się ją jako sekwencję TATA lub **kasetę TATA** (ang. TATA box). Podczas wiązania się do DNA, TFIID powoduje silne wygięcie DNA (rys. 8-24), które staje się punktem orientacyjnym dla przyłączania się innych białek w miejscu promotora. Kaseta TATA jest kluczowym składnikiem niemal wszystkich



Rys. 8-23. Inicjacja transkrypcji eukariotycznego genu przez polimerazę RNA II. Aby rozpocząć transkrypcję, polimeraza RNA wymaga kilku ogólnych czynników transkrypcyjnych (nazywanych TFIIA, TFIIB itd.). (A) Promotor zawiera sekwencję DNA nazywaną kasetą TATA, która jest oddalona o 25 nukleotydów od miejsca inicjacji transkrypcji. (B) Kasetę TATA rozpoznaje i wiąże czynnik transkrypcyjny TFIID, co z kolei umożliwia przyłączenie się obok czynnika TFIIB (C). Dla uproszczenia na rysunku nie przedstawiono odkształcenia DNA, powstającego w wyniku przyłączenia TFIID (patrz rys. 8-24). (D) Pozostałe ogólne czynniki transkrypcyjne oraz polimeraza RNA składają się w miejscu promotora. (E) TFIIH za pomocą ATP fosforyluje polimerazę RNA II, zmieniając jej konformację w taki sposób, że enzym może się uwolnić z kompleksu i rozpocząć transkrypcję. Jak pokazano, miejscem fosforylacji jest długi „ogon" polipeptydowy, wystający poza cząsteczkę polimerazy.

Właściwy porządek, w jakim ogólne czynniki transkrypcyjne składają się w miejscu promotora, nie został dotąd dokładnie poznany. Istnieje pogląd, że ogólne czynniki transkrypcyjne składają się z polimerazą poza DNA i dopiero cały kompleks wiąże się do DNA. Ogólne czynniki transkrypcyjne są silnie konserwatywne w ewolucji; niektóre, pochodzące z komórek człowieka czynniki transkrypcyjne można w warunkach eksperymentalnych wymienić na odpowiednie czynniki pochodzące z drożdży



Rys. 8-24. Trójwymiarowa struktura TBP związanego z kasetą TATA. TBP (ang. TATA-binding protein — białko wiążące się z TATA) jest podjednostką ogólnego czynnika transkrypcyjnego TFIID, odpowiedzialną za rozpoznanie i związanie sekwencji kasety TATA na DNA (kolor *czerwony*). Wyjątkowe ułożenie DNA spowodowane przez TBP — dwa zgięcia dwuniciowej helisy rozdzielone przez częściowo rozwinięty DNA — może służyć jako punkt orientacyjny, który pomaga w przyłączaniu innych ogólnych czynników transkrypcyjnych. TBP jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym zwiniętym w dwie bardzo podobne domeny (kolor *niebieski* i *zielony*). (Adaptacja z: J.L. Kim et al., *Nature* 365: 520–527, 1993)

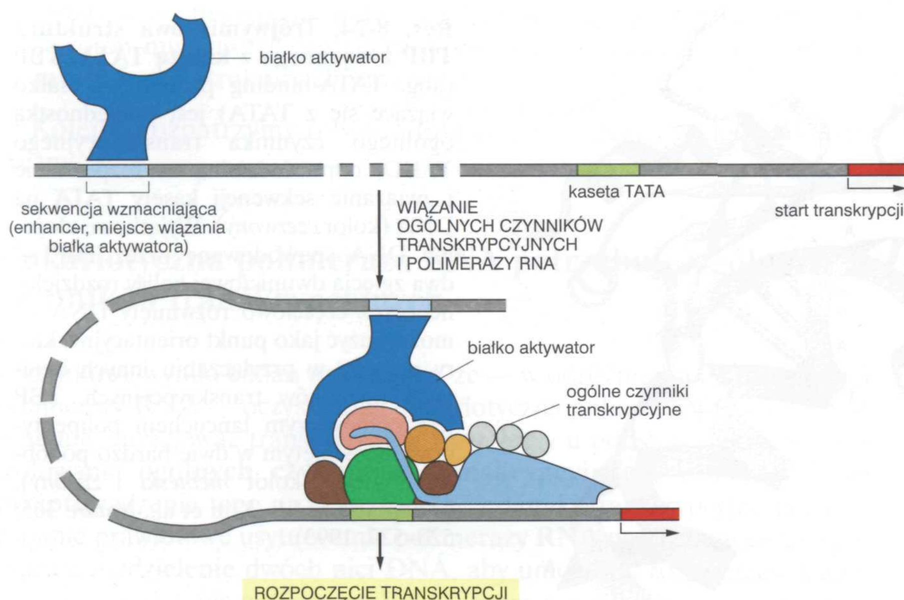
promotorów wykorzystywanych przez polimerazę RNA II i typowo jest zlokalizowana 25 nukleotydów powyżej miejsca startu transkrypcji. Zaraz po przyłączeniu do tego miejsca na DNA pierwszego ogólnego czynnika transkrypcyjnego, przyłączają się następne czynniki wraz z polimerazą RNA II, tworząc cały *kompleks inicjujący transkrypcję*.

Polimeraza RNA II związana z promotorowym DNA w kompleksie inicjującym musi zostać uwolniona z tego kompleksu, żeby rozpocząć budowanie cząsteczki RNA. Kluczowym tego etapem jest dodanie grup fosforanowych do polimerazy RNA, przeprowadzane przez czynnik transkrypcyjny TFIIH, którego jedną z podjednostek jest enzym kinaza białkowa (patrz rys. 8-23E). Fosforylacja ma na celu uwolnienie polimerazy z grupy czynników transkrypcyjnych, co umożliwia rozpoczęcie transkrypcji. Następnie uwalniane są ogólne czynniki transkrypcyjne, dzięki czemu mogą inicjować następną rundę transkrypcji z udziałem innej cząsteczki polimerazy RNA.

Eukariotyczne białka regulatorowe mogą kontrolować ekspresję oddalonych genów

Dowiedzieliśmy się, że bakterie kontrolują ekspresję swoich genów za pomocą specjalnych białek regulatorowych (aktywatorów i represorów). Komórki eukariotyczne stosują tę samą podstawową strategię. Mimo że eukariotyczne ogólne czynniki transkrypcyjne wraz z polimerazą RNA mogą inicjować transkrypcję *in vitro* (patrz rys. 8-23), wewnątrz komórki białka te nie mogą samodzielnie rozpoczynać transkrypcji. Niemal wszystkie promotory eukariotyczne potrzebują białek aktywatorowych, aby wspomóc proces łączenia się czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA.

Miejsca DNA, do których przyłączają się aktywatory genów eukariotycznych, nazwano *sekwencjami wzmacniającymi* (ang. enhancer), ponieważ ich obecność radykalnie zwiększa, czyli wzmacnia tempo transkrypcji. Zaskoczeniem dla biologów było odkrycie w 1979 r., że białka aktywatorowe mogą wiązać się z sekwencjami oddalonymi tysiące par zasad od promotora. Co więcej, aktywatory eukariotyczne mogą wpływać na transkrypcję genu wiążąc się do sekwencji położonych zarówno



Rys. 8-25. Model aktywacji oddalonych genów u eukariotów. W tym przykładzie ogólne czynniki transkrypcyjne i polimeraza RNA nie mogą się składać w miejscu promotorowym. Proces składania się kompleksu jest stymulowany dopiero przez przyłączenie się białka regulatorowego do sekwencji wzmacniającej (enhancer). Utworzenie pętli DNA umożliwia kontakt między białkiem regulatorowym, związanym z sekwencją wzmacniającą a kompleksem transkrypcyjnym przyłączonym do promotora. Linia przerywana DNA oznacza, że długość DNA między sekwencją wzmacniającą a miejscem startu transkrypcji może sięgać dziesiątek tysięcy par nukleotydów

przed, jak i za genem. Jak sekwencje wzmacniające i przyłączone do nich białka mogą funkcjonować na taką odległość? W jaki sposób mogą komunikować się z promotorem?

Zaproponowano wiele modeli działania na odległość, ale wydaje się, że w większości przypadków ma zastosowanie najprostszy z nich. DNA między sekwencją wzmacniającą a promotorem tworzy pętlę, która pozwala białkom aktywatorowym związanym z sekwencją wzmacniającą kontaktować się z polimerazą RNA lub jednym z czynników transkrypcyjnych, które są związane z promotorem (rys. 8-25). DNA działa więc w postaci pętli utworzonej w wyniku oddziaływania białek przyłączonych do sekwencji wzmacniającej, oddalonej o tysiące nukleotydów, z kompleksem białek związanych z promotorem.

U eukariotów białka regulatorowe wiążące się z odległymi sekwencjami regulatorowymi mogą zarówno zwiększać jak i zmniejszać aktywność polimerazy RNA przyłączonej do promotora. Jednym ze sposobów działania jest wpływ na składanie się kompleksu inicjującego transkrypcję. Aktywatory ułatwiają montowanie się kompleksu, natomiast represory uniemożliwiają jego prawidłowe składanie.

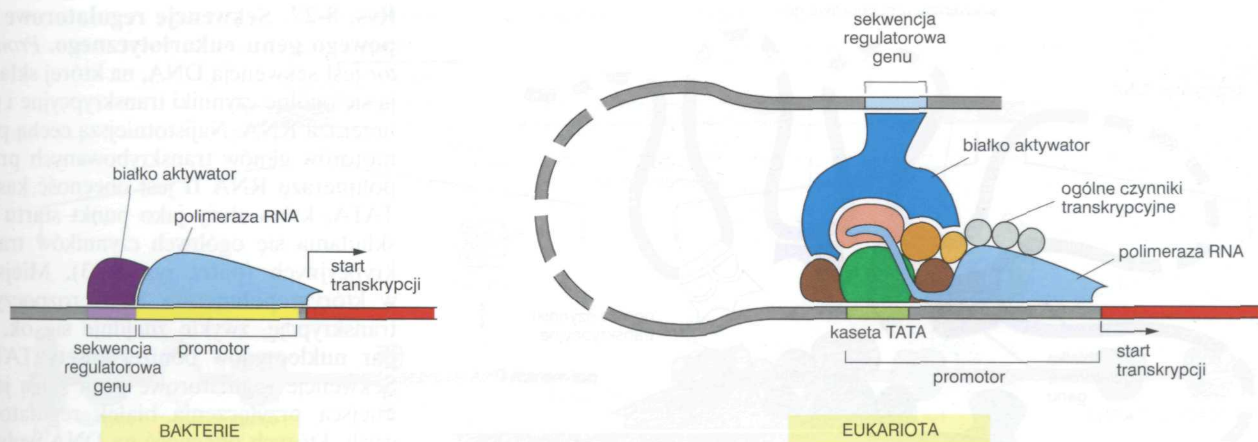
Na rysunku 8-26 przedstawiono porównanie bakteryjnej i eukariotycznej regulacji genów. W obu przypadkach białka regulatorowe mogą kontrolować ekspresję genów przez wspomaganie lub hamowanie przyłączania się i działania polimerazy RNA w miejscu promotorowym. Eukariotyczne białka regulatorowe wiążą się z sekwencjami regulatorowymi DNA, które są odpowiednikami bakteryjnych operatorów i sekwencji wiążących aktywatory, ale zwykle są znacznie oddalone od promotora.

Pytanie 8-6. Niektóre białka regulatorowe genów (nie omówione w tekście tego rozdziału) wiążąc się do DNA powodują, że dwuniciowa helisa DNA zgina się pod kątem ostrym. Takie białka zginające mogą wpływać na inicjację transkrypcji nie kontaktując się z polimerazą RNA, którymś z ogólnych czynników transkrypcyjnych lub jakimś innym białkiem regulatorowym. Czy możesz zaproponować prawdopodobne wytłumaczenie, w jaki sposób białka te mogą działać *jako modulatory transkrypcji? Narysuj sche*mat, który zilustruje twoje wyjaśnienie.

Na inicjację transkrypcji może wpływać uwikłanie promotorowej sekwencji DNA w nukleosomy

Na inicjację transkrypcji w komórkach eukariotycznych musi mieć wpływ upakowanie DNA w chromatynę. Czy nawinięty na nukleosomy DNA jest dostępny dla białek regulatorowych, czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA? W jaki sposób upakowanie DNA wpływa na inicjację transkrypcji?

Wcześniej w tym rozdziale stwierdziliśmy, że wydaje się, iż geny, ulegające ekspresji występują w chromatynie rozproszonej; jednak DNA nadal



Rys. 8-26. Podstawowe różnice w mechanizmie aktywacji genów u bakterii i eukariotów. Dodatkowo eukariotyczny DNA jest upakowany w nukleosomy (nie pokazane)

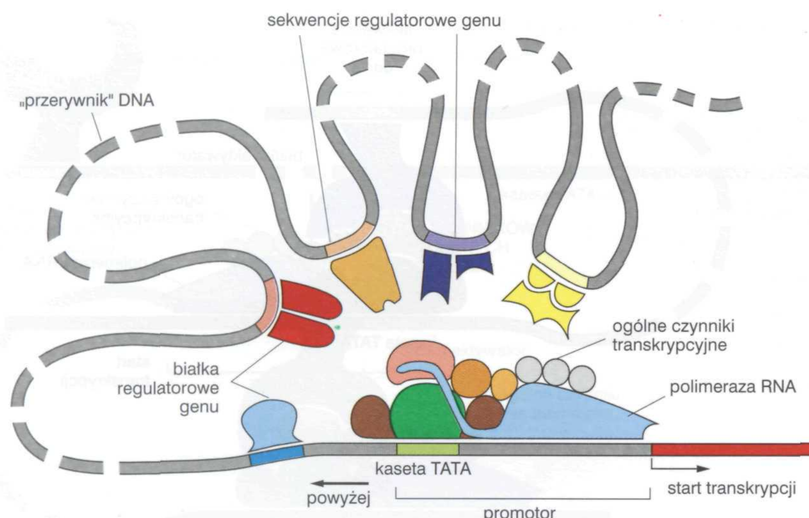
nawinięty jest na nukleosomy. Obecność nukleosomów nie blokuje stadium elongacji transkrypcji, ponieważ polimeraza RNA może przejść przez nukleosomy, tylko czasowo zaburzając ich strukturę. Nukleosomy mogą jednak hamować inicjację transkrypcji i jeśli zajmują pozycję przed promotorem, prawdopodobnie uniemożliwiają wiązanie się ogólnych czynników transkrypcyjnych lub polimerazy RNA do DNA.

Ponieważ nukleosomy są rozmieszczone wzdłuż DNA w regularnych odstępach bez widocznej specyficzności w stosunku do sekwencji, prawdopodobne jest, że również występują przed regionami promotorowymi. Kiedy jest aktywowana transkrypcja genu, te nukleosomy są przemieszczane, choć dotąd nie ustalono dokładnie, w jaki sposób to przemieszczenie zachodzi. Niewykluczone, że komórka ma wyspecjalizowane białka, których zadaniem jest przenoszenie nukleosomów z miejsc promotorowych i umożliwianie w ten sposób montowania się kompleksu transkrypcyjnego. Inna możliwość to występowanie fazy wstępnej przed inicjacją transkrypcji, w trakcie której histony w pobliżu promotora zostają chemicznie zmodyfikowane, co wpływa destabilizująco na nukleosomy.

Nukleosomy utworzone w miejscach regulatorowych sekwencji DNA również mogą wpływać na ekspresję genów poprzez blokowanie przyłączania się białek regulatorowych. Mimo dowodów na to, że niektóre sekwencje regulatorowe są eksponowane w regionach DNA wolnych od nukleosomów, wydaje się, iż pewne białka regulatorowe są zdolne do wiązania się ze swoim regulatorowym DNA nawet jeśli jest on nawinięty na nukleosomy, prawdopodobnie ponieważ w tym samym czasie destabilizują je i częściowo rozmontowują.

Wzajemne relacje między strukturą chromatyny a inicjacją transkrypcji są dopiero na wczesnym etapie poznania. Komórki rozwinęły kilka mechanizmów, które umożliwiają inicjację transkrypcji DNA nawiniętego na nukleosomy. Z drugiej strony jest oczywiste, że bardziej skondensowane formy chromatyny (występujące w chromosomach mitotycznych, nieaktywnych chromosomach X i innych regionach heterochromatyny w chromosomach interfazowych) są odporne na inicjację transkrypcji. Przypuszczalnie jest to spowodowane brakiem dostępu białek regulatorowych, czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA do ściśle upakowanego DNA. Jednak dopiero zaczynamy poznawać białka, które są odpowiedzialne za wzrost stopnia kondensacji DNA.

W następnej części rozdziału przedyskutujemy, w jaki sposób kombinacje białek aktywatorowych i represorowych regulują ekspresję typowego genu eukariotycznego, zawartego w chromatynie aktywnej.



Rys. 8-27. Sekwencje regulatorowe typowego genu eukariotycznego. *Promotor* jest sekwencją DNA, na której składają się ogólne czynniki transkrypcyjne i polimeraza RNA. Najistotniejszą cechą promotorów genów transkrybowanych przez polimerazę RNA II jest obecność kasety TATA, która służy jako punkt startu do składania się ogólnych czynników transkrypcyjnych (patrz rys. 8-23). Miejsce, w którym polimeraza RNA rozpoczyna transkrypcję, zwykle znajduje się ok. 25 par nukleotydów poniżej kasety TATA. Sekwencje regulatorowe genu służą jako miejsca przyłączenia białek regulatorowych, których obecność na DNA wpływa na szybkość inicjacji transkrypcji. Sekwencje regulatorowe mogą być położone w sąsiedztwie promotora, daleko powyżej niego, a nawet poniżej genu. Utworzenie pętli DNA pozwala białkom regulatorowym genu, związanym z miejscami odległymi od promotora, oddziaływać z białkami, które składają się na promotorze.

Ogólne czynniki transkrypcyjne, składające się w miejscu promotorowym, są takie same dla wszystkich genów transkrybowanych przez polimerazę RNA II, natomiast białka regulatorowe genów oraz położenie rozpoznawanych przez nie miejsc w stosunku do promotorów są różne dla różnych genów. Szybkość inicjacji transkrypcji jest określana przez połączenie działania różnych białek regulatorowych.

Dotąd jednak dla żadnego genu nie wyjaśniono dokładnie, w jaki sposób efekty działania różnych białek regulatorowych są ze sobą powiązane

Geny eukariotyczne są regulowane przez kombinacje białek

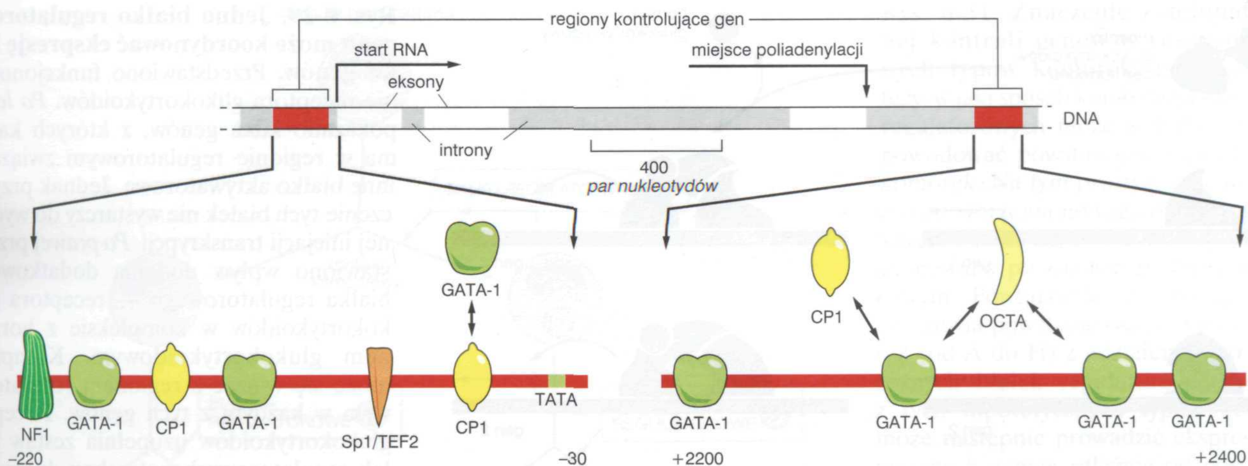
Sekwencje kontrolujące ekspresję genów mogą rozciągać się wzdłuż długich obszarów DNA, ponieważ eukariotyczne białka regulatorowe genów mogą kontrolować transkrypcję, kiedy są związane z DNA odległym od promotora o kilka tysięcy par nukleotydów. Nie jest czymś niezwykłym odnalezienie u zwierząt i roślin sekwencji regulatorowych genu oddalonych od promotora nawet o 50000 par nukleotydów, mimo że DNA pomiędzy nimi nie jest rozpoznawany przez białka regulatorowe genów i służy jako „przerywnik" (ang. spacer).

Do tej pory traktowaliśmy białka regulatorowe genów jako zdolne do indywidualnego włączania lub wyłączania genów. Takie założenie jest słuszne dla wielu białek regulatorowych u bakterii, natomiast u eukariotów białka regulatorowe genów działają w zespołach. Białka regulatorowe wchodzące w skład takiego zespołu są niezbędne do zapoczątkowania ekspresji genu i decydują o tym, że ekspresja zachodzi we właściwej komórce, w odpowiedzi na określone warunki, w odpowiednim czasie i na wymaganym poziomie.

Termin **kontrola kombinatoryczna** odnosi się do sposobu, w jaki grupa białek współpracuje w ustalaniu ekspresji pojedynczego genu. Na zainicjowanie transkrypcji u eukariotów ma wpływ wiele różnych białek wiążących się z sekwencją regulatorową (rys. 8-27). Większość genów eukariotycznych ma kontrolne regiony DNA, zawierające liczne miejsca rozpoznawane przez białka aktywujące i hamujące ekspresję. Na rysunku 8-28 schematycznie przedstawiono region regulatorowy, który kontroluje ekspresję ludzkiego genu β-globiny. Dopiero zaczynamy poznawać mechanizmy molekularne, za pomocą których sumuje się efekt oddziaływania różnych białek regulatorowych, wyznaczając ostateczny poziom ekspresji genu.

Jedno białko może koordynować ekspresję różnych genów

Zarówno bakterie, jak i eukariota muszą być zdolne nie tylko do włączania lub wyłączania pojedynczych genów, lecz także do koordynowania ekspresji różnych genów. Na przykład kiedy komórka eukariotyczna otrzymuje sygnał do podziału, zostaje równocześnie włączonych kilka genów dotychczas nie ulegających ekspresji i w rezultacie może dojść do podziału komórki (patrz rozdz. 15). U bakterii jedyną drogą zapewnienia so-



Rys. 8-28. Model regulacji ludzkiego genu β-globiny. Przedstawiono niektóre białka regulatorowe, prawdopodobnie kontrolujące ekspresję genu podczas rozwoju czerwonych krwinek. Niektóre z przedstawionych białek, jak na przykład CP1, spotykane są w wielu typach komórek, podczas gdy inne, takie jak GATA-1, są obecne tylko w kilku typach komórek z prekursorami czerwonych krwinek włącznie, i dlatego uważa się, że uczestniczą w swoistej, uzależnionej od typu komórki, ekspresji genu β-globiny. Niektóre z miejsc wiązania GATA-1 obejmują miejsca rozpoznawane przez inne białka regulatorowe (*dwukierunkowe strzałki*); uważa się, że zajmowanie tych miejsc przez GATA-1 wyklucza przyłączanie się innych białek. (Adaptacja z: B. Emerson, General and Cell-Type Specific. In: *Gene Expression,* M. Karin ed., s. 116–161. Boston: Birkhauser, 1993)

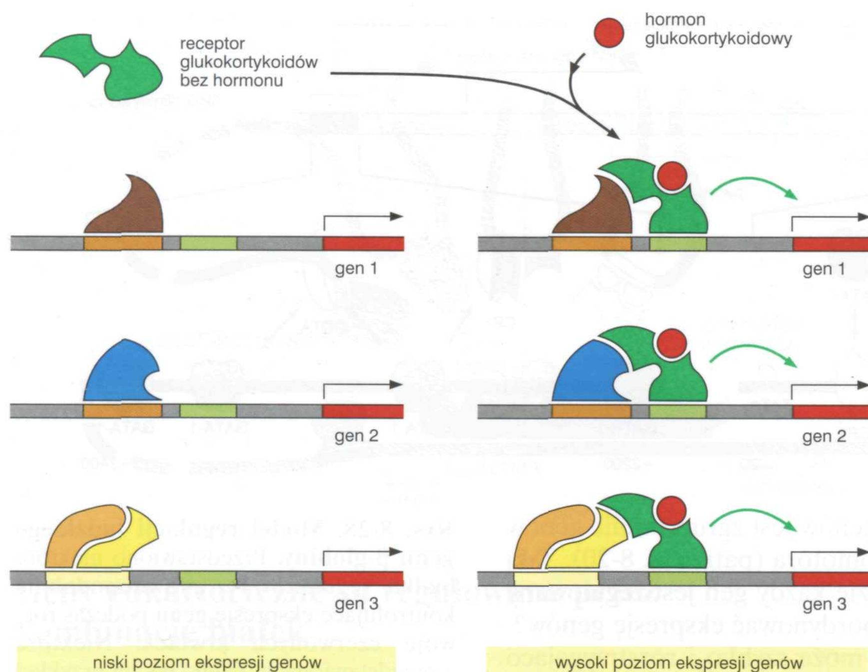
bie koordynacji ekspresji zespołu różnych genów jest zgrupowanie genów w operonie pod kontrolą pojedynczego promotora (patrz rys. 8-20). Taki przypadek nie występuje u eukariotów, gdzie każdy gen jest regulowany indywidualnie. Jak więc eukariota mogą koordynować ekspresję genów?

W jaki sposób komórka eukariotyczna może szybko i rozstrzygająco włączać całe grupy genów, skoro używa zespołu białek regulatorowych do kontrolowania każdego swojego genu? Mimo że kontrola ekspresji genów ma charakter kombinatoryczny, efekt pojedynczego białka regulatorowego może być nadal rozstrzygający we włączaniu lub wyłączaniu określonego genu. Dzieje się tak poprzez uzupełnienie kombinacji niezbędnej do aktywacji lub represji genu. Jest to jak dodanie końcowego numeru w zamku cyfrowym: zamek otworzy się jeśli pozostałe cyfry zostały wprowadzone uprzednio. Jak ta sama cyfra może dopełniać kombinacje szyfrów dla różnych zamków, tak to samo białko może uzupełniać kombinacje zespołu białek dla kilku różnych genów. Jeśli kilka różnych genów ma miejsce regulatorowe dla tego samego białka regulatorowego, może być ono użyte do kontrolowania ekspresji każdego z nich.

Przykładem takiego działania u ludzi jest *białkowy receptor glukokortykoidów*. Jest to białko regulatorowe, które musi utworzyć kompleks z cząsteczką glukokortykoidu, hormonu steroidowego (np. kortyzolu, patrz tab. 15-1, s. 487), zanim zwiąże się z regulatorowym DNA. Hormon jest uwalniany w ciele pod wpływem głodu i intensywnego wysiłku fizycznego; stymuluje on między innymi komórki wątroby do zwiększonej produkcji glukozy z aminokwasów i innych małych cząsteczek. Komórki wątroby w odpowiedzi na hormony glukokortykoidowe zwiększają ekspresję wielu różnych genów, wśród których są geny kodujące enzym aminotransferazę tyrozynową, pomagający w przekształcaniu tyrozyny w glukozę. Wszystkie te geny są regulowane poprzez związanie się kompleksu hormon – receptor glukokortykoidowy z sekwencją regulatorową genu. Kiedy organizm odzyskuje równowagę, zaprzestaje wydzielania hormonu, a ekspresja wszystkich tych genów powraca do normalnego poziomu. W ten sposób pojedyncze białko regulatorowe może kontrolować ekspresję wielu różnych genów (rys. 8-29).

Kombinatoryczna kontrola może prowadzić do powstawania różnych typów komórek

Zdolność do włączania i wyłączania różnych genów z użyciem jednego białka jest przydatna nie tylko w codziennym funkcjonowaniu komórki. Jest to również jeden ze sposobów różnicowania się komórek eukariotycznych na poszczególne typy podczas rozwoju embrionalnego.



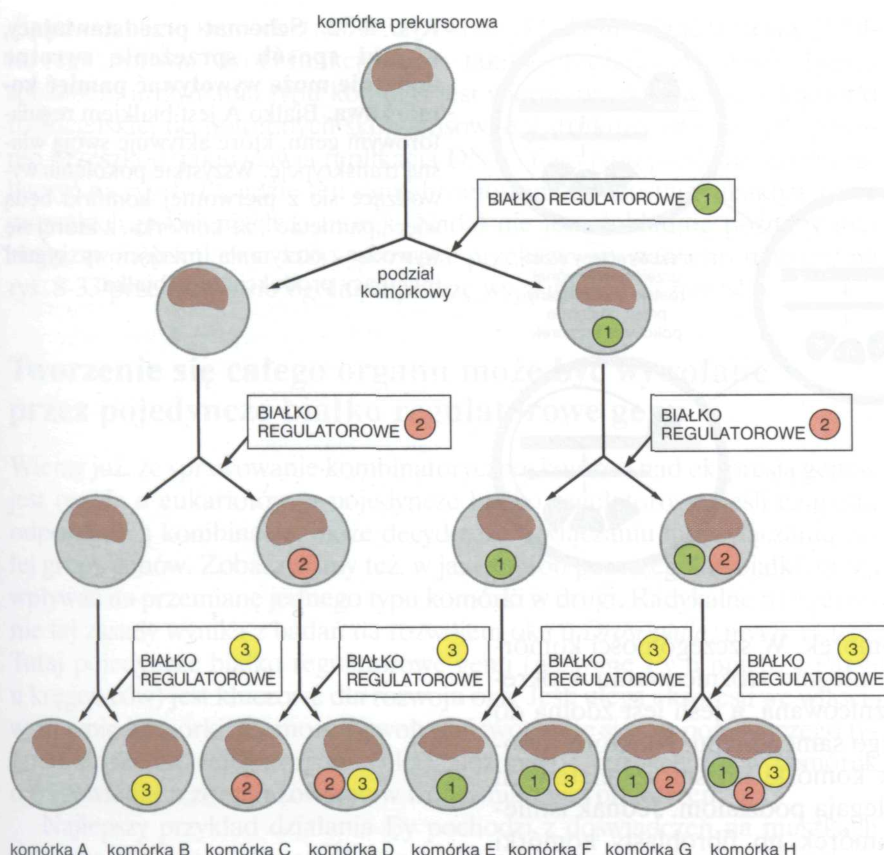
Rys. 8-29. Jedno białko regulatorowe genu może koordynować ekspresję kilku genów. Przedstawiono funkcjonowanie receptora glikokortykoidów. *Po lewej* pokazano kilka genów, z których każdy ma w regionie regulatorowym związane inne białko aktywatorowe. Jednak przyłączenie tych białek nie wystarczy do wydajnej inicjacji transkrypcji. *Po prawej* przedstawiono wpływ dodania dodatkowego białka regulatorowego — receptora glukokortykoidów w kompleksie z hormonem glukokortykoidowym. Kompleks może się wiązać z regionem regulatorowym w każdym z tych genów. Receptor glukokortykoidów uzupełnia zestaw białek regulatorowych potrzebny do wydajnej inicjacji transkrypcji, w wyniku czego następuje włączenie całej grupy genów

Uderzający przykład działania pojedynczego białka regulatorowego genu na różnicowanie się pochodzi z badań nad rozwojem komórek mięśniowych. Komórka mięśni szkieletowych ssaka stanowi wysoce wyspecjalizowany typ komórek. Zazwyczaj jest to niezwykle długa komórka utworzona przez fuzję wielu komórek prekursorowych mięśni (dlatego ma wiele jąder), nazywanych *mioblastami*. Dojrzała komórka mięśniowa różni się od innych komórek tym, że wytwarza dużą ilość charakterystycznych białek, takich jak aktyna i miozyna, biorących udział w tworzeniu aparatu kurczliwego (patrz rozdz. 16) oraz białek receptorowych i budujących kanały jonowe w błonie komórkowej, które z kolei zapewniają komórce wrażliwość na stymulację nerwową. Wszystkie geny kodujące białka specyficzne dla mięśni są włączane w sposób skoordynowany, kiedy mioblasty przystępują do fuzji. Dzięki badaniom na kulturach różnicujących się komórek mięśni zidentyfikowano kluczowe białka regulatorowe genów. Ulegają one ekspresji tylko w potencjalnych komórkach mięśniowych, koordynując tam ekspresję genów, przez co decydują o różnicowaniu się komórek mięśniowych. Te białka regulatorowe wiążąc się z sekwencjami DNA obecnymi w ich regionach regulatorowych, aktywują transkrypcję genów kodujących białka specyficzne dla mięśni.

Białka regulatorowe tego typu mogą przekształcić inną komórkę w komórkę mięśniową poprzez aktywację ekspresji genów typowych dla różnicujących się komórek mięśni. Jeśli gen *myoD*, kodujący jedno z tego typu białek regulatorowych, zostanie wprowadzony do fibroblastów wyhodowa-



Rys. 8-30. Efekt ekspresji białka MyoD w fibroblastach. Mikrografia immunofluorescencyjna przedstawia fibroblasty ze skóry zarodka kury, które zostały przekształcone w komórki mięśniowe w wyniku eksperymentalnie indukowanej ekspresji genu *myoD*. Fibroblasty, które uzyskały białko regulatorowe MyoD połączyły się, tworząc wydłużoną, wielojądrową komórkę mięśniopodobną, którą wybarwiono na zielono za pomocą przeciwciał wykrywających białka specyficzne dla mięśni. Fibroblasty, w których gen *myoD* nie został indukowany, są słabo widoczne w tle. (Dzięki uprzejmości: Stephen Tapscott i Harold Weintraub)



Rys. 8-31. Znaczenie kombinatorycznej kontroli genów w tworzeniu różnych typów komórek. Ilustracja hipotezy, w jaki sposób kombinacja kilku białek regulatorowych może w trakcie rozwoju powodować powstawanie różnych typów komórek. Na tym prostym schemacie decyzja utworzenia nowego białka regulatorowego (*ponumerowane kółko*) jest podejmowana po każdym podziale komórkowym. Powtarzanie tej prostej zasady umożliwia powstanie ośmiu typów komórek (od A do H) z udziałem tylko trzech różnych białek regulatorowych. Każdy z tych hipotetycznych typów komórek może następnie prowadzić ekspresję odmiennych genów zależnie od posiadanej kombinacji białek regulatorowych

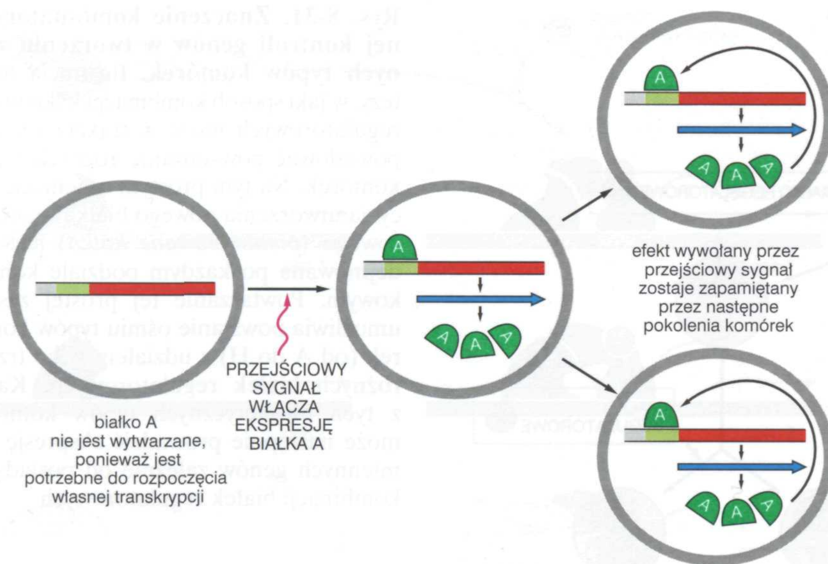
nych z komórek pobranych z tkanki łącznej skóry, to fibroblasty zaczynają zachowywać się jak mioblasty i łączą się, tworząc komórki mięśniopodobne. Na rysunku 8-30 przedstawiono radykalny wpływ ekspresji *myoD* w fibroblastach. Wydaje się, że fibroblasty, które pochodzą z tej samej ogólnej klasy komórek embrionalnych co komórki mięśniowe, mają nagromadzone pozostałe białka regulatorowe, niezbędne do kombinatorycznej kontroli genów specyficznych dla mięśni, a dodanie MyoD uzupełnia unikatową kombinację i kieruje komórkę do rozwijania się w mięsień. Niektóre typy komórek nie przekształcają się w mięśnie po wprowadzeniu do nich MyoD; prawdopodobnie komórki te nie akumulowały w trakcie swojego rozwoju pozostałych niezbędnych białek regulatorowych.

Na rysunku 8-31 schematycznie przedstawiono, w jaki sposób akumulacja białek regulatorowych może prowadzić do powstawania różnych typów komórek. Rysunek przedstawia również, jak ograniczony zestaw białek regulatorowych może sprawować kontrolę nad ekspresją dużej liczby genów, poprzez stosowanie kombinatorycznej kontroli i wspólnych sekwencji regulatorowych.

Przemiana jednego typu komórek (fibroblasty) w drugi (mięśnie) za pomocą pojedynczego białka regulatorowego potwierdza jedną z najistotniejszych zasad omawianych w tym rozdziale: radykalne różnice pomiędzy typami komórek — takie jak ich rozmiar, kształt i spełniane funkcje — są wynikiem różnic w ekspresji genów.

Stabilne wzorce ekspresji genów mogą być przekazywane do komórek potomnych

Wszystkie komórki, zarówno bakteryjne jak i eukariotyczne, muszą być zdolne do włączania i wyłączania genów. Organizmy wielokomórkowe potrzebują jednak specjalnych mechanizmów włączania genów do wytwa-

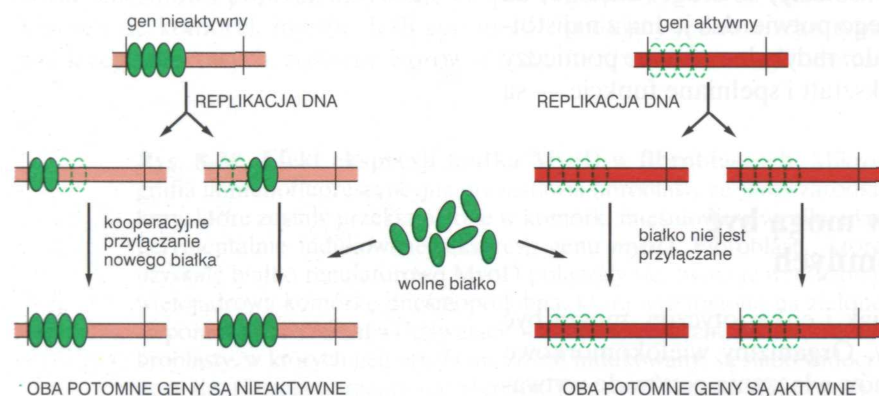


Rys. 8-32. Schemat przedstawiający, w jaki sposób sprzężenie zwrotne dodatnie może wywoływać pamięć komórkową. Białko A jest białkiem regulatorowym genu, które aktywuje swoją własną transkrypcję. Wszystkie pokolenia wywodzące się z pierwotnej komórki będą więc „pamiętać", że komórka, z której się wywodzą, otrzymała przejściowy sygnał inicjujący produkcję tego białka

rzania i utrzymywania różnych typów komórek. W szczególności komórka organizmu wielokomórkowego, która ulegnie zróżnicowaniu w określony typ, ogólnie biorąc pozostanie zróżnicowana, a jeśli jest zdolna do podziałów, jej potomne komórki będą tego samego typu. Niektóre wysoce wyspecjalizowane komórki, takie jak komórki mięśni szkieletowych i neurony, po zróżnicowaniu nigdy nie ulegają podziałom. Jednak istnieje wiele innych typów zróżnicowanych komórek, np. fibroblasty, komórki mięśni gładkich czy komórki wątroby (hepatocyty), które dzielą się wiele razy w trakcie życia osobnika. Wszystkie te typy komórek dają początek jedynie takim komórkom, jakimi były same w trakcie podziału: w wyniku podziału z komórek mięśni gładkich nie powstaną komórki wątroby, a z wątroby nie powstaną fibroblasty.

Oznacza to, że w odróżnieniu od tymczasowych zmian w ekspresji genów, które występują zarówno u bakterii, jak i w komórkach eukariotycznych, zmiany w ekspresji genów dające początek różnicowaniu komórki muszą być zapamiętywane i przekazywane do komórek potomnych w ciągu wszystkich późniejszych podziałów komórkowych. Na przykład w komórkach pokazanych na rys. 8-31 raz rozpoczęta produkcja każdego białka regulatorowego zachodzi nieustannie w komórkach potomnych. W jaki sposób jest to realizowane?

Istnieje kilka mechanizmów, dzięki którym komórki potomne „zapamiętują", do jakiego rodzaju komórek powinny należeć. Najprostszy z nich to **dodatnie sprzężenie zwrotne**, polegające na tym, że kluczowe białko regulatorowe aktywuje transkrypcję własnego genu oraz genów specyficznych



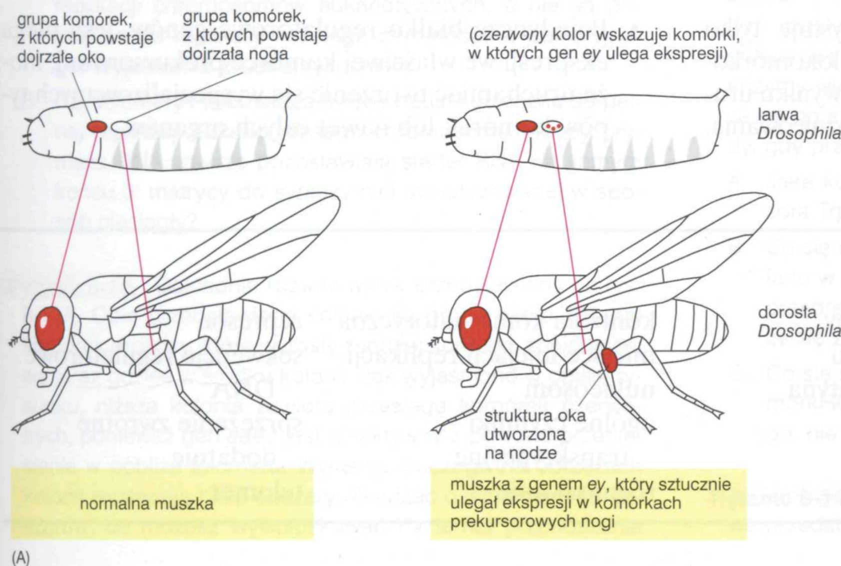
Rys. 8-33. Ogólny schemat umożliwiający dziedziczenie stanu ekspresji genu podczas replikacji DNA. W tym hipotetycznym modelu część zestawu białek chromosomowych kooperacyjnie związanych z DNA zostaje bezpośrednio przeniesiona z rodzicielskiej helisy DNA (*na górze po lewej*) na obie helisy potomne. Odziedziczone zestawy białek powodują, że każda z potomnych helis przyłącza dodatkowe kopie tych samych białek. Ponieważ wiązanie następuje w sposób kooperacyjny, a białka są dostarczane w niewielkiej ilości, DNA syntetyzowany z identycznej rodzicielskiej helisy DNA, która nie miała związanych białek (*na górze po prawej*), będzie ich pozbawiony

dla danego typu komórki (rys. 8-32). Na przykład omawiane wcześniej białko regulatorowe MyoD funkcjonuje w takim sprzężeniu zwrotnym. Innym sposobem utrzymania typu komórki jest wierne przekazywanie z komórki rodzicielskiej do potomnych skondensowanej struktury chromatyny pomimo przeszkód, jakie stawia replikacja DNA. Tego typu przykład można zobaczyć na rys. 8-12, gdzie ten sam chromosom X pozostaje nieaktywny we wszystkich pokoleniach komórek. Nadal nie jest dokładnie poznany mechanizm molekularny, który pozwala przekazywać stan chromatyny; na rys. 8-33 przedstawiono ogólną hipotezę wyjaśniającą to zjawisko.

Tworzenie się całego organu może być wywołane przez pojedyncze białko regulatorowe genu

Wiemy już, że sprawowanie kombinatorycznej kontroli nad ekspresją genów jest regułą u eukariotów, a pojedyncze białko regulatorowe, jeśli uzupełni odpowiednią kombinację, może decydować o włączaniu lub wyłączaniu całej grupy genów. Zobaczyliśmy też, w jaki sposób poszczególne białko może wpływać na przemianę jednego typu komórki w drugi. Radykalne rozszerzenie tej zasady wynika z badań na rozwojem oka u *Drosophila*, myszy i ludzi. Tutaj pojedyncze białko regulatorowe genu (nazwane Ey u much, a Pax-6 u kręgowców) jest kluczowe dla rozwoju oka. Jeśli ulega ekspresji we właściwym typie komórki, Ey może wywoływać tworzenie się nie pojedynczego typu komórki, ale całego organu (oka), złożonego z różnych typów komórek o odpowiednim zorganizowaniu w trójwymiarowej przestrzeni.

Najlepszy przykład działania Ey pochodzi z doświadczeń na muszkach owocowych, u których wywoływano sztuczną ekspresję genu *ey* w trakcie rozwoju w komórkach, które normalnie tworzyły nogi (rys. 8-34). Oko *Drosophila* jest złożone z tysięcy komórek. Nie ustalono dotąd, w jaki sposób białko Ey kontroluje specyficzny rozwój różnych typów komórek oka. Wydaje się, że Ey bezpośrednio kontroluje ekspresję wielu innych genów poprzez wiązanie się z ich sekwencjami regulatorowymi. Niektóre z genów kontrolowanych przez Ey kodują białka regulatorowe, wpływające z kolei na ekspresję innych genów. Tak więc działanie tylko jednego białka regulatorowego może zapoczątkować kaskadę białek regulatorowych, których działanie prowadzi do tworzenia i organizowania grupy wielu różnych typów komórek. Można sobie wyobrazić, stosując powtórzenia tej zasady, jak fragment po fragmencie powstaje złożony organizm.





Rys. 8-34. Ekspresja genu *ey* w komórkach prekursorowych nogi *Drosophila* prowadzi do rozwoju oka na nodze. (A) Uproszczony schemat przedstawia rezultat normalnej ekspresji genu *ey* u larwy muszki owocowej (*po lewej*) oraz dodatkowej, sztucznej ekspresji tego genu w komórkach, z których rozwijają się nogi (*po prawej*). (B) Zdjęcie anormalnej nogi z niewłaściwie umieszczonym okiem. (B dzięki uprzejmości: Walter Gehring)

Streszczenie

- Materiał genetyczny komórki eukariotycznej zawarty jest w chromosomie lub chromosomach, z których każdy utworzony jest z jednej, niezmiernie długiej cząsteczki DNA, zawierającej wiele genów.
- DNA w chromosomie zawiera oprócz genów także wiele miejsc inicjacji replikacji, jeden centromer i dwa telomery. Dzięki tym sekwencjom chromosom może być wydajnie replikowany i przenoszony do komórek potomnych.
- Chromosomy w komórkach eukariotycznych zawierają DNA ściśle związany z wyspecjalizowanymi białkami, których masa niemal dorównuje masie DNA. Białka te zwijają DNA w formy bardziej skondensowane, dzięki czemu może się on zmieścić w jądrze komórkowym. Kompleks DNA i białek w chromosomach nazywa się chromatyną.
- W skład białek związanych z DNA wchodzą histony, które upakowują DNA w powtarzający się układ cząstek złożonych z białka i DNA, nazywanych nukleosomami.
- Za pomocą cząsteczki histonu H1 nukleosomy przybierają formę włókna 30 nm. Włókno to może być następnie zwijane lub fałdowane.
- Niektóre formy chromatyny są tak zwarte, że geny w nich zawarte są transkrypcyjnie wyciszone. W takim stanie są wszystkie geny na chromosomie podczas podziału komórkowego (mitozy), kiedy chromosomy stają się wysoce skondensowane.
- Specyficzne regiony chromosomów, nazywane heterochromatyną, są skondensowane i nieaktywne również w komórkach nie dzielących się. Geny sztucznie przeniesione w regiony heterochromatyny często ulegają wyciszeniu.
- Typowa komórka eukariotyczna wykorzystuje tylko część swoich genów; w organizmach wielokomórkowych odmienne typy komórek powstają w wyniku uruchamiania różnych grup genów w trakcie różnicowania.
- Wszystkie etapy ekspresji genu mogą podlegać regulacji, jednak większość genów jest regulowana na etapie inicjacji transkrypcji.
- W komórkach eukariotycznych transkrypcja pojedynczych genów jest włączana lub wyłączana przez białka regulatorowe genów. Działają one poprzez wiązanie się z krótkimi odcinkami DNA — sekwencjami regulatorowymi DNA.
- Chociaż każde białko regulatorowe genów ma unikatowe cechy, większość tych białek wiąże się z DNA za pomocą kilku motywów strukturalnych. Ściśle określona sekwencja aminokwasowa zaangażowana w utworzenie motywu pozwala rozpoznać specyficzną sekwencję DNA.
- Polimeraza RNA wiąże się z DNA i inicjuje transkrypcję w miejscu nazywanym promotorem.
- U bakterii białka regulatorowe zwykle wiążą się z sekwencją regulatorową DNA położoną w pobliżu miejsca wiązania się polimerazy RNA, aktywując lub hamując transkrypcję genu. U eukariotów sekwencje regulatorowe często są oddzielone od promotora wieloma tysiącami par nukleotydów.
- Aby zainicjować transkrypcję, eukariotyczne polimerazy RNA potrzebują utworzenia się w miejscu promotorowym kompleksu, który jest złożony z ogólnych czynników transkrypcyjnych. Eukariotyczne białka regulatorowe genów prawdopodobnie działają poprzez wpływanie na proces formowania kompleksu, przyspieszając go (aktywatory) lub hamując (represory).
- U eukariotów ekspresję genu zazwyczaj kontrolują kombinacje białek regulatorowych genów.
- U wielokomórkowych roślin i zwierząt wytwarzanie różnych białek regulatorowych genów w różnych typach komórek zapewnia ekspresję jedynie tych genów, które są właściwe dla danego typu komórki.
- Pojedyncze białko regulatorowe genów, jeśli ulega ekspresji we właściwej komórce prekursorowej, może uruchamiać tworzenie się wyspecjalizowanych typów komórek lub nawet całych organów.

Hasła

aktywator
białko regulatorowe genu
centromer
chromatyna
chromosom
chromosom mitotyczny
efekt pozycyjny
ekspresja genu
heterochromatyna
histon
jąderko
kaseta TATA
kontrola kombinatoryczna
miejsce inicjacji replikacji
nukleosom
ogólne czynniki transkrypcyjne
różnicowanie
represor
sekwencje regulatorowe DNA
sprzężenie zwrotne dodatnie
telomer

Pytania

Pytanie 8-7. Które z poniższych twierdzeń są prawdziwe? Uzasadnij odpowiedzi.

A. Każdy chromosom eukariotyczny musi zawierać następujące elementy sekwencji DNA: wiele miejsc startu replikacji, dwa telomery i jeden centromer.

B. U bakterii geny kodujące rybosomowe RNA, tRNA i mRNA ulegają transkrypcji przez różne polimerazy RNA.

C. U bakterii, ale nie u eukariotów, większość mRNA koduje więcej niż jedno białko.

D. Większość białek wiążących DNA wiąże się do większego rowka w dwuniciowej helisie.

E. Spośród czterech głównych etapów w kontroli ekspresji genów (transkrypcja, dojrzewanie RNA, translacja i kontrola aktywności białek), zdecydowana większość przypadków regulacji odbywa się na etapie inicjacji transkrypcji.

F. W białkach wiążących DNA, które zawierają domeny palców cynkowych, atomy cynku współdziałają w rozpoznaniu specyficznej sekwencji DNA poprzez tworzenie specyficznych oddziaływań z zasadami.

G. Polimeraza RNA kończy transkrypcję w regionach DNA, które są nawinięte na nukleosomy.

H. Cząstki rdzeniowe nukleosomu mają 30 nm średnicy i, jeśli są ustawione rzędem, to tworzą filamenty o średnicy 30 nm.

Pytanie 8-8. Zdefiniuj następujące terminy oraz wyjaśnij, jak są ze sobą powiązane.

A. Chromosom interfazowy.

B. Chromosom mitotyczny.

C. Chromatyna.

D. Heterochromatyna.

E. Histony.

F. Nukleosom.

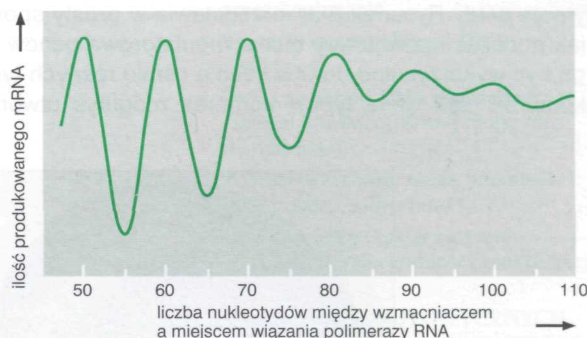
Pytanie 8-9

A. Wyjaśnij dlaczego telomery i telomeraza są konieczne do replikacji chromosomów eukariotycznych, a nie są potrzebne do replikacji kolistego chromosomu bakteryjnego. Wyjaśnienie zilustruj rysunkiem.

B. Czy telomery i telomeraza byłyby nadal konieczne do pełnej replikacji eukariotycznego chromosomu, gdyby prymaza DNA zawsze pozostawiała starter RNA na samym końcu 3′ matrycy do syntezy nici syntetyzowanej w sposób nieciągły?

Pytanie 8-10. Dokładnie rozważ wynik przedstawiony na rys. 8-13A. Obie przedstawione kolonie są grupą około 100 000 komórek drożdży, które wyrosły z jednej komórki, znajdującej się teraz gdzieś w środku kolonii. Jak wyjaśniono w opisie rysunku, niższa kolonia zawiera przewagę komórek czerwonych, ponieważ gen *ade2* jest nieaktywny z powodu przeniesienia w pobliże telomeru. Wyjaśnij, dlaczego na obrzeżach kolonii występują białe obszary. Wiedząc o istnieniu tych obszarów, co możesz wywnioskować na temat przenoszenia stanu aktywności transkrypcyjnej genu *ade2* z komórki rodzicielskiej do komórek potomnych?

Pytanie 8-11. Twoim zadaniem w laboratorium profesora Quasimodo jest oznaczenie, jak daleko można przenieść wzmacniacz transkrypcji (enhancer, miejsce wiązania dla białka aktywatorowego) od promotora genu „prostego kręgosłupa", zachowując aktywną transkrypcję genu. Systematycznie zmieniasz liczbę par nukleotydów pomiędzy tymi dwoma miejscami, a następnie określasz poziom transkrypcji przez pomiar wytwarzania mRNA „prostego kręgosłupa".



Rys. P8-11

Na pierwszy rzut oka twoje wyniki są zagmatwane (rys. P8-11). Co możesz wywnioskować z wyników tego eksperymentu? Czy możesz ocalić swoją reputację i wyjaśnić te wyniki profesorowi Quasimodo?

Pytanie 8-12. Wiele białek regulatorowych genów tworzy dimery na DNA, składające się z identycznych lub nieco różnych podjednostek. Dlaczego jest to korzystne? Opisz trzy motywy strukturalne często wykorzystywane w kontaktowaniu się białek z DNA. Jakie są ich szczególne cechy dostosowujące je do tego celu?

Pytanie 8-13. Komórki bakteryjne mogą pobierać tryptofan (Trp) z otoczenia, a gdy występuje on w środowisku w niedostatecznych ilościach, mogą go syntetyzować z innych, małych cząsteczek. Represor Trp jest bakteryjnym białkiem regulatorowym, które hamuje transkrypcję genów kodujących enzymy wymagane do syntezy tryptofanu. Represor Trp wiąże się do miejsca w obrębie promotora tych genów tylko wtedy, gdy przyłączy cząsteczki tryptofanu (patrz rys. 8-21).

A. Jaka korzyść płynie z tej szczególnej właściwości represora Trp?

B. Co się może stać z regulacją enzymów biosyntezy tryptofanu w komórkach wytwarzających zmutowaną formę represora, która 1. nie może wiązać się do DNA lub 2. wiąże się z DNA, nawet jeśli nie przyłączy tryptofanu?

C. Co się stanie w scenariuszach 1. i 2., jeśli dodatkowo komórki wytwarzają normalne białko represora Trp z drugiego, nie zmutowanego genu?

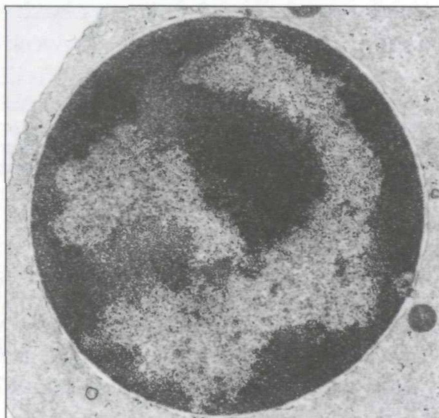
Pytanie 8-14. Na rysunku P8-14 dwie mikrografie elektronowe przedstawiają jądra komórkowe w dwóch różnych typach

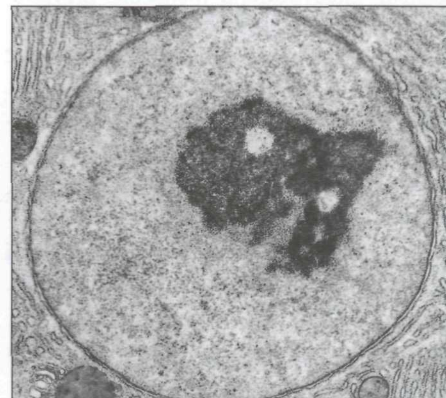
komórek. Czy na podstawie tych zdjęć możesz powiedzieć, która z tych dwóch komórek transkrybuje więcej genów? Uzasadnij odpowiedź.

Pytanie 8-15. Wszystkie zróżnicowane komórki organizmu zawierają te same geny. (Jednym z niewielu wyjątków od tej reguły są komórki systemu immunologicznego ssaków, gdzie tworzenie się wyspecjalizowanych komórek opiera się na małych rearanżacjach genomu). Opisz eksperyment, który udowodni pierwsze zdanie tego pytania, oraz wyjaśnij, dlaczego tak jest?

Pytanie 8-16. Rysunek 8-31 przedstawia w prosty sposób, jak podczas rozwoju trzy białka regulatorowe genów mogą być wykorzystane do utworzenia ośmiu różnych typów komórek. Jak wiele typów komórek mógłbyś utworzyć, opierając się na tej samej zasadzie, za pomocą czterech różnych białek regulatorowych? Białko regulatorowe MyoD samo jest w stanie indukować w fibroblastach ekspresję genów specyficznych dla mięśni. W jaki sposób ta obserwacja wpasowuje się w schemat (rys. 8-31)?

Pytanie 8-17. Omów następujące rozumowanie: „Jeśli ekspresja każdego genu zależy od zespołu białek regulatorowych, to ekspresja tych białek regulatorowych musi również zależeć od ekspresji innych białek regulatorowych genów, a ich ekspresja musi zależeć od ekspresji jeszcze innych białek regulatorowych itd. Komórki mogłyby więc potrzebować nieskończonej ilości genów, z których większość kodowałaby białka regulatorowe genów". W jaki sposób komórka radzi sobie z tym problemem?


(A)


(B)

Mikrografie dzięki uprzejmości: Don W. Fawcett

Rys. P8-14

9

Zmienność genetyczna

ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA BAKTERII

- **Duża szybkość podziałów komórek bakteryjnych oznacza pojawianie się mutacji w stosunkowo krótkim czasie**
- **Bakterie zawierające mutacje można selekcjonować zmieniając warunki środowiska komórek**
- **Komórki bakterii mogą uzyskać geny od innych bakterii**
- **Geny bakteryjne mogą być przenoszone przez koniugację**
- **Bakterie mogą pobierać DNA z otoczenia**
- **Dwie cząsteczki DNA o podobnej sekwencji nukleotydowej mogą ulec rekombinacji**
- **Wirusy bakteryjne mogą przenosić geny między bakteriami**
- **Ruchome elementy genetyczne są źródłem różnorodności genetycznej**

ŹRÓDŁA ZMIAN GENETYCZNYCH W GENOMACH EUKARIOTYCZNYCH

- **Rodziny pokrewnych genów powstają przez przypadkowe duplikacje DNA**
- **Geny kodujące nowe białka mogą powstawać przez rekombinację eksonów**
- **Duża część DNA wielokomórkowych eukariotów składa się z powtarzających się sekwencji niekodujących**
- **Dwie rodziny sekwencji transpozonowych zajmują około 10% genomu człowieka**
- **Elementy ulegające transpozycji przyspieszyły ewolucję genomów**
- **Wirusy są w pełni ruchomymi elementami genetycznymi, zdolnymi do opuszczenia komórki**
- **Retrowirusy odwracają normalny przepływ informacji genetycznej**
- **Retrowirusy zawierające geny przejęte od gospodarza mogą być rakotwórcze**

ROZMNAŻANIE PŁCIOWE I SEGREGACJA GENÓW

- **Rozmnażanie płciowe decyduje o możliwości lepszego dostosowania się organizmów do nieprzewidywalnych zmian środowiska**
- **Rozmnażanie płciowe łączy komórki diploidalne i haploidalne**
- **Podczas mejozy komórki haploidalne powstają z komórek diploidalnych**
- **Mejoza jest źródłem olbrzymiej zmienności genetycznej**

W poprzednich trzech rozdziałach przedstawiono, w jaki sposób informacja potrzebna do budowy i utrzymywania się żywych organizmów jest przechowywana w nukleotydowej sekwencji DNA i jak ulega precyzyjnej replikacji, że w rezultacie komórki potomne dziedziczą od komórek macierzystych tę informację w niezmienionej postaci. DNA może jednak ulegać mutacjom. W dostatecznie dużej grupie ludzi poszczególne osoby różnią się wieloma dziedzicznymi cechami, takimi jak kolor oczu, kolor skóry, barwa włosów, wzrost, budowa itd. Osoby te ewidentnie mają genomy o nieidentycznych sekwencjach nukleotydowych. Co więcej, ogromna różnorodność otaczającego nas życia — np. roślin, owadów, ssaków — powstała w wyniku zmian, które gromadziły się w DNA praktycznie już od chwili powstania pierwszych komórek, a więc od ok. 3,5 miliarda lat.

W najszerszym sensie termin *zmienność genetyczna* oznacza różnorodność genomów decydującą o powstaniu różnych indywidualnych istot na naszej planecie. Obejmuje on zarówno stosunkowo małe różnice pomiędzy genomami osobników tego samego gatunku, jak i znacznie większe różnice występujące między genomami odrębnych gatunków. W tym rozdziale rozpatrzymy, jak genomy zmieniały się podczas ewolucji. Ewolucja faworyzuje układy, w których takie zmiany są nie tylko możliwe, lecz wręcz konieczne, a różnorodność mechanizmów umożliwiających zmiany genetyczne sugeruje, że są one korzystne dla utrzymania życia na zmieniającej się Ziemi.

Źródłem zmienności genetycznej są mutacje w DNA, modyfikujące sekwencje nukleotydowe i tym samym informacyjną zawartość DNA. Niektóre z nich są małymi zmianami sekwencji nukleotydowych, takimi jak powstające wskutek rzadkich pomyłek podczas replikacji DNA i jego naprawy (zagadnienie to omówiono w rozdz. 6). Istnieją jednak zmiany znacznie bardziej radykalne, powodujące zmiany genomu na dużą skalę. Obejmują znaczne rearanżacje (zmiany układu) sekwencji nukleotydowych, duplikacje (podwojenia) poszczególnych genów lub nawet większych obszarów genomu, delecje (ubytki) części genomu, przeniesienie fragmentu jednego chromosomu do innego itd. Rearanżacje zachodzące na dużą skalę są rezultatem różnorodnych procesów, w tym *rekombinacji DNA*, aktywacji wirusów i *ruchomych elementów genetycznych*, które mogą wchodzić do DNA i opuszczać go.

Mutacje nie są jedynym źródłem zmienności genetycznej. W organizmach rozmnażających się płciowo różnice osobnicze są w dużym stopniu wynikiem segregacji puli genów danego gatunku i tworzenia się nowych ich kombinacji u różnych osobników. W tym rozdziale omówiono zarówno mutacje, jak i segregację jako ważne źródła zmian genetycznych.

Rozpoczniemy od zmienności genetycznej bakterii. Bakterie są komórkami najprostszymi genetycznie i najszybciej rosnącymi, dlatego należą do organizmów najintensywniej badanych. W rezultacie jesteśmy bliżsi pełnego poznania procesów życiowych bakterii niż jakiegokolwiek innego organizmu. Pomimo oczywistej prostoty genetycznej, bakterie dysponują prawie wszystkimi mechanizmami prowadzącymi do zmienności genetycznej, omówionymi w tym rozdziale. Wprowadzenie do genetyki bakterii będzie służyło też jako wprowadzenie do kluczowej roli odgrywanej przez bakterie oraz ich plazmidy i wirusy w rewolucyjnych technikach *rekombinacyjnej technologii DNA*, stanowiącej przedmiot rozdz. 10.

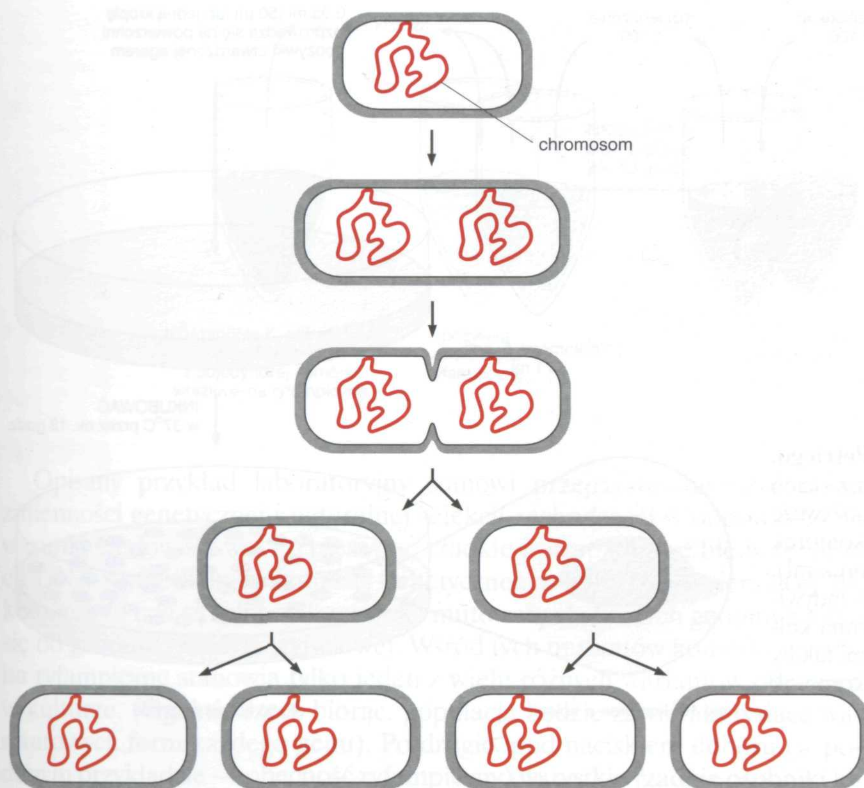
W drugiej części niniejszego rozdziału dokonamy przeglądu niektórych głównych dróg ewolucji i różnicowania się genomów eukariotycznych. W końcu wrócimy do mejozy i genetycznej rekombinacji, stanowiących główne źródło genetycznych różnic osobniczych u organizmów rozmnażających się płciowo.

Zmienność genetyczna bakterii

Escherichia coli — w skrócie *E. coli* jest bakterią żyjącą w symbiotycznych stosunkach z ludźmi i innymi ssakami. Miliardy komórek *E. coli* zasiedlają nasze jelito grube (okrężnicę), wykorzystując składniki pokarmowe, które uniknęły strawienia lub absorpcji w żołądku lub jelicie cienkim. Żyjąc na tych molekularnych okruchach, bakterie syntetyzują na swój użytek aminokwasy i witaminy, z których pewne dostają się do naszego krwiobiegu i są wykorzystywane przez nasz organizm. Na przykład bakterie te są dla nas głównym źródłem witaminy K.

Szerokie rozpowszechnienie *E. coli*, łatwość jej wzrostu na rozmaitych źródłach pokarmowych i duża szybkość podziałów komórkowych — wcześnie dostrzeżone przez bakteriologów — zadecydowały, że bakterie te przyjęto powszechnie jako standardowy organizm eksperymentalny. Inną zaletą bakterii, takich jak *E. coli*, stosowanych jako obiekty badawcze — jest ich *haploidalność*, co oznacza, że zawierają tylko jedną kopię genomu. W przeciwieństwie do nich organizmy *diploidalne*, takie jak nasze, w każdej komórce (z wyjątkiem gamet, które omówimy w dalszej części tego rozdziału) mają po dwie kopie genomu. Jeśli bakteryjny gen ulegnie mutacji, to często wywołuje wykrywalną zmianę dziedziczną charakterystyki (*fenotypu*) bakterii. Natomiast mutacja w organizmie diploidalnym nie musi powodować zmiany fenotypowej, ponieważ każda komórka zawiera drugą, nie zmutowaną kopię tego samego genu, która może kompensować efekty genu zmutowanego.

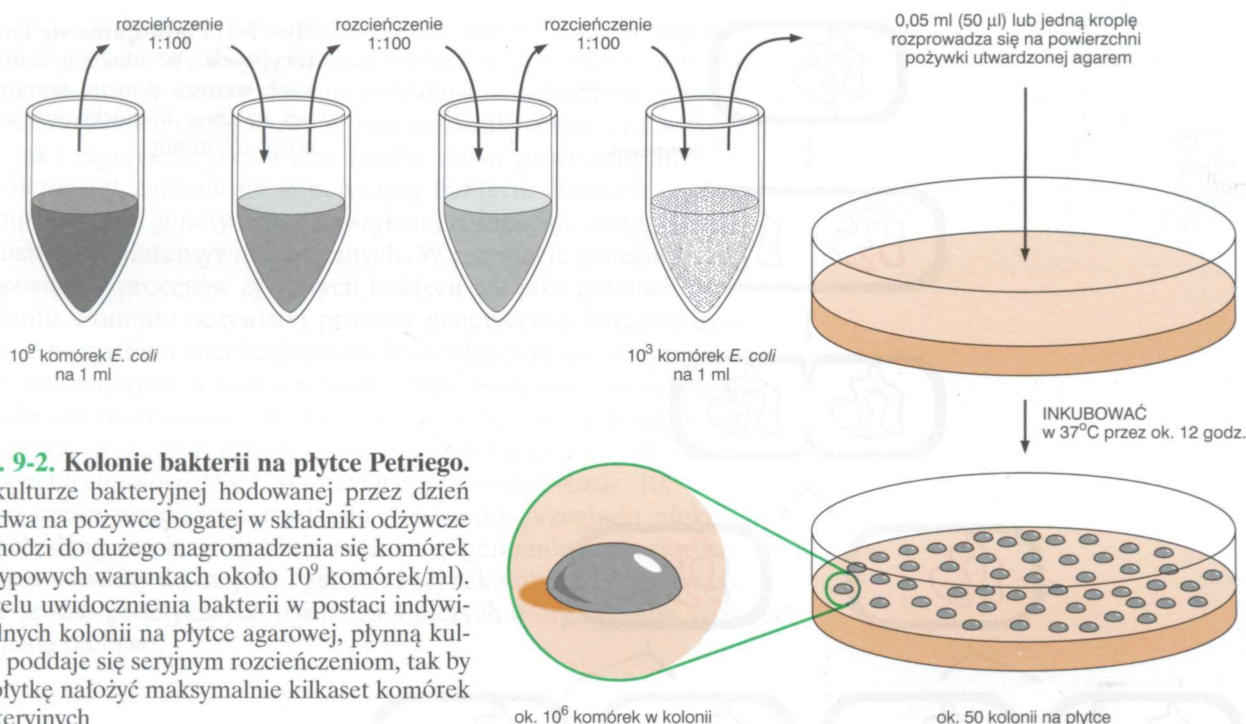
Wiele spośród zasadniczych podstaw biologii molekularnej, omawianych w rozdz. 6, 7 i 8, odkryto właśnie w *E. coli* i dzisiaj, po stu latach badań, funkcjonowanie *E. coli* znamy dokładniej niż jakiegokolwiek innego organizmu. Przykład *E. coli* posłuży nam jako doskonałe wprowadzenie do podstawowych mechanizmów będących źródłem zmienności genetycznej oraz do przedstawienia, w jaki sposób warunki środowiska wywierają presję selekcyjną (nacisk doboru), która opierając się na zmienności, wywołuje zmiany ewolucyjne.



Rys. 9-1. Podwajanie się komórek bakteryjnych. W idealnie dobrych warunkach wzrostu podział komórki bakteryjnej na dwie komórki potomne zachodzi co 20–25 minut

Duża szybkość podziałów komórek bakteryjnych oznacza pojawianie się mutacji w stosunkowo krótkim czasie

Bakterie, takie jak *E. coli*, rozmnażają się bezpłciowo przez proste podziały komórkowe. Ich DNA ulega replikacji i rozdzieleniu do dwóch końców rosnącej komórki, która następnie dzieli się na dwie komórki potomne, obie zawierające genom identyczny z genomem komórki wyjściowej (macierzystej), jeśli założymy brak pomyłek podczas replikacji (rys. 9-1). W warunkach laboratoryjnych *E. coli* szybko rośnie w płynnych pożywkach zawierających dostatek aminokwasów, cukrów i soli. W takich pożywkach populacja komórek *E. coli* ulega podwojeniu co 20–25 min pod warunkiem dobrego napowietrzania kultury (dostarczania tlenu) i utrzymywania jej w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała ludzkiego (37°C). W czasie krótszym niż jeden dzień z pojedynczej komórki *E. coli* może powstać populacja komórek potomnych większa od liczby ludzi żyjących dziś na Ziemi. Poszczególne komórki bakterii są o wiele za małe, by dostrzec je gołym okiem, ale jeśli rosną na stałym podłożu, potomstwo każdej pojedynczej komórki tworzy odrębne kolonie, dające się z łatwością zauważyć. Stałe podłoże do hodowli bakterii najczęściej przygotowuje się z agaru, obojętnego polisacharydu uzyskiwanego z morskich wodorostów, tworzącego stały żel. Aby wykorzystać agar jako podłoże do wzrostu bakterii, żel się topi, miesza z innymi składnikami pożywki, wylewa na płytki Petriego i zestala poprzez ochłodzenie. Następnie na powierzchni tak przygotowanej płytki rozprowadza się kroplę rozcieńczonej zawiesiny bakterii. Jeśli stężenie bakterii w zawiesinie jest dostatecznie małe, to pojedyncze komórki zostają na płytce oddzielone od siebie i każda z nich doprowadzi do powstania odrębnej kolistej kolonii, zawierającej ok. 10^6 komórek (rys. 9-2). Można następnie pobrać komórki z pojedynczej kolonii i rozmnożyć je do dalszych badań.



Rys. 9-2. Kolonie bakterii na płytce Petriego. W kulturze bakteryjnej hodowanej przez dzień lub dwa na pożywce bogatej w składniki odżywcze dochodzi do dużego nagromadzenia się komórek (w typowych warunkach około 10^9 komórek/ml). W celu uwidocznienia bakterii w postaci indywidualnych kolonii na płytce agarowej, płynną kulturę poddaje się seryjnym rozcieńczeniom, tak by na płytkę nałożyć maksymalnie kilkaset komórek bakteryjnych

Genomem *E. coli* jest kolista cząsteczka DNA składająca się z ok. 4–5 milionów par nukleotydów. Genom ten koduje ok. 3000 różnych białek. Chociaż replikacja komórkowego DNA jest bardzo dokładna, nie jest jednak absolutnie bezbłędna. Jak przedstawiono w rozdz. 6, podczas replikacji DNA istnieje niewielkie prawdopodobieństwo ($\sim 1/10^9$), że któryś z nukleotydów zostanie niepoprawnie skopiowany i błąd ten uniknie korekty. Chociaż prawdopodobieństwo to jest bardzo małe, jednak duża szybkość podziałów komórkowych *E. coli* decyduje, że eksperymentator w stosunkowo krótkim czasie może uzyskać dużą populację komórek, w których wystąpi wiele pomyłek replikacyjnych.

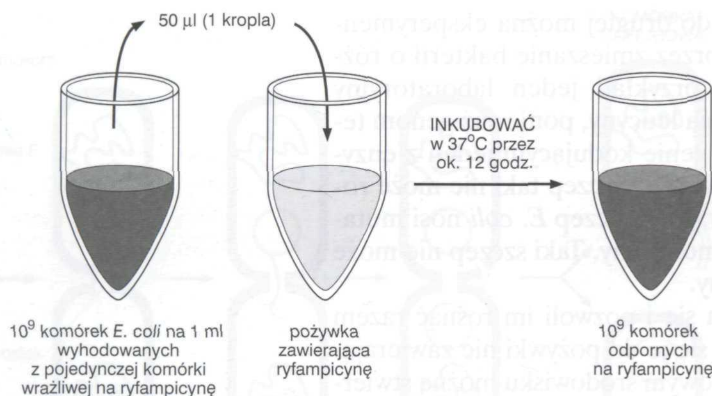
Pytanie 9-1. Podczas ćwiczeń laboratoryjnych z mikrobiologii potraktowałeś kulturę bakteryjną związkiem chemicznym wywołującym mutacje. Aby zbadać poszczególne zmutowane szczepy, które powstały w rezultacie tego działania, musisz uzyskać populacje bakterii, z których każda pochodziłaby z pojedynczej zmutowanej komórki. W tym celu asystent prowadzący zajęcia (instruktor) polecił posiać 50 µl kultury poddanej działaniu mutagennego związku (zawierającej 1000 komórek/ml) na płytki agarowe (jak pokazano na rys. 9-2), tak by uzyskać kolonie bakteryjne powstałe z pojedynczych zmutowanych komórek. Komórki z poszczególnych kolonii będzie można następnie poddać testom.

Starszy kolega (znany z tendencji do „chodzenia na skróty") sugerował, abyś po prostu pobrał próbki po 1 µl kultury poddanej mutagenezie i umieścił je w oddzielnych probówkach. Sugerował dalej, by próbki te rozcieńczyć pożywką, inkubować w 37°C i — proszę bardzo — masz wiele niezależnych kultur, z których każda pochodzi od pojedynczej komórki, można więc pominąć żmudne wysiewanie.

Czy zaakceptujesz sugestię starszego kolegi? A może jego sugestia odzwierciedla fakt, że nie ukończył on jeszcze studiów? Uzasadnij odpowiedź.

Bakterie zawierające mutacje można selekcjonować zmieniając warunki środowiska komórek

Aby wykryć i wyizolować bakterie, w których wystąpiły mutacje, zmutowane komórki trzeba zidentyfikować i oddzielić od dominującej populacji bakterii nie zmutowanych. Typową komórkę *E. coli* można zabić za pomocą antybiotyku ryfampicyny. Ryfampicyna silnie wiąże się z cząsteczkami polimerazy RNA znajdującymi się wewnątrz komórki, co w rezultacie hamuje transkrypcję. Inhibicja transkrypcji powoduje brak syntezy nowych białek i komórka ostatecznie zamiera. Jednak duża populacja *E. coli* (na przykład 10^9 komórek zawartych w kilku mililitrach szybko rosnącej kultury w płynnej pożywce) prawdopodobnie zawiera kilka komórek opornych na działanie ryfampicyny. W takich komórkach gen kodujący polimerazę RNA uległ rzadkiej mutacji w taki sposób, że koduje polimerazę RNA wciąż zdolną do transkrypcji DNA na RNA, ale niewrażliwą na atak ryfampicyny. Gdy do rosnącej kultury *E. coli* doda się ryfampicyny, prawie wszystkie komórki zostaną zabite, ale jeśli w tej hodowli znajdują się mutanty niewrażliwe na ten antybiotyk, to mogą one świetnie się rozwijać i w krótkim czasie zdominować całą kulturę (rys. 9-3).



Rys. 9-3. Mutacje i naturalna selekcja w populacji bakterii. Jeśli kulturę bakteryjną przeniesie się do nowych warunków (na przykład do środowiska zawierającego antybiotyk ryfampicynę), to rzadkie mutanty wykazujące większą zdolność do przetrwania (odporne na ryfampicynę) mogą się mnożyć i opanowują całą populację

Opisany przykład laboratoryjny stanowi przejrzystą ilustrację zasad zmienności genetycznej i naturalnej selekcji zachodzącej w odpowiedzi na warunki środowiskowe. Po pierwsze, rzadkie i przypadkowe błędy replikacji DNA są źródłem zmienności genetycznej; w kulturze zawierającej 10^9 komórek *E. coli* są miliony komórek zmutowanych, których genomy różnią się od genomu komórki wyjściowej. Wśród tych mutantów komórki oporne na ryfampicynę stanowią tylko jeden z wielu różnych wariantów obecnych w kulturze. (Ogólnie rzecz biorąc, populacja będzie zawierała tysiące wariantowych form każdego genu). Po drugie, pod naciskiem doboru (w podanym przykładzie — obecność ryfampicyny) wszystkie rzadkie osobniki lepiej przystosowane do przeżycia (w omawianym przykładzie komórki oporne na ryfampicynę) będą się mnożyć i ostatecznie zdominują populację.

Każda dostatecznie duża populacja bakterii zawiera prócz obok dominującego genotypu pewną pulę bakterii zmutowanych, stanowiących źródło różnych wariantów genetycznych. Duża populacja *E. coli* opornych na ryfampicynę, która opanowała kulturę rosnącą na pożywce zawierającej ten antybiotyk, także zawiera pulę komórek stanowiących jeszcze inne warianty genetyczne i jeśli warunki środowiskowe ulegną zmianie, to jakiś inny genotyp wykaże cechy korzystne selekcyjnie i w rezultacie stanie się w danych warunkach genotypem dominującym. Tak więc to, że replikacja DNA nie zawsze zachodzi w sposób perfekcyjnie dokładny, umożliwia populacji *E. coli* szybką adaptację genetyczną do zmieniających się warunków otoczenia.

Jeśli warunki środowiskowe nie ulegają zmianie, to istnieje mała szansa na opanowanie populacji przez mutanty, ponieważ wśród mutacji, które — mimo zaistnienia — umożliwią bakteriom przeżycie, wiele nie będzie miało żadnego funkcjonalnego wpływu na fenotyp, natomiast wiele innych będzie nieco szkodliwe. Na przykład mutanty *E. coli* oporne na ryfampicynę często gorzej tolerują skrajne temperatury niż komórki typu dzikiego, w rezultacie więc usunięcie ryfampicyny z pożywki spowoduje stopniową eliminację komórek zmutowanych.

Pytanie 9-2. Gen *lacY E. coli* koduje białko transportujące cukier — laktozę — z otoczenia do wnętrza komórki, gdzie ulega on rozpadowi i zostaje wykorzystany jako paliwo. Komórka *E. coli* zawierająca w genie *lacY* mutację decydującą o dysfunkcyjności białka nie może dlatego rosnąć na podłożu, w którym jedynym związkiem pokarmowym jest laktoza. Po wysianiu na takie podłoże agarowe 10^9 komórek *E. coli* zmutowanych w genie *lacY*, powstało ok. 50 kolonii.

A. Dzięki czemu kolonie te mogły powstać?
B. Jeśli eksperyment ten powtarza się wychodząc z komórek zmutowanych w genie *lacY*, ale zawierających dodatkową mutację inaktywującą system usuwający błędy sparowania zasad (patrz rozdz. 6), to powstaje 3000 kolonii. Czy możesz wyjaśnić wzrost liczby powstających kolonii?

Komórki bakterii mogą uzyskać geny od innych bakterii

Błędy replikacyjne, ważne dla genetycznych adaptacji *E. coli*, nie stanowią jedynego możliwego sposobu zmian genomu bakterii. Chociaż mieszanie się genów pochodzących od różnych osobników wskutek ich rozmnażania płciowego znano od dawna, jednak dopiero w latach pięćdziesiątych odkryto, że bakterie także dysponują mechanizmami umożliwiającymi przemieszanie się genów różnych osobników w populacji.

Przeniesienie genów z jednej bakterii do drugiej można eksperymentalnie zademonstrować w prosty sposób przez zmieszanie bakterii o różnych właściwościach genetycznych. Na przykład jeden laboratoryjny szczep *E. coli* jest niezdolny do wytwarzania leucyny, ponieważ genom tego szczepu zawiera szkodliwą mutację w genie kodującym jeden z enzymów potrzebnych do syntezy tego aminokwasu. Szczep taki nie może rosnąć na pożywce, w której nie ma leucyny. Inny szczep *E. coli* nosi mutację, która uniemożliwia mu wytwarzanie metioniny. Taki szczep nie może rosnąć na pożywce pozbawionej metioniny.

Jeśli dwa takie szczepy *E. coli* zmiesza się i pozwoli im rosnąć razem przez kilka godzin, a następnie przeniesie się je do pożywki nie zawierającej ani leucyny ani metioniny, to w takim nowym środowisku można stwierdzić obecność szybko rosnących komórek bakteryjnych. Komórki te stanowią nowy szczep *E. coli*, zdolny do syntetyzowania obu aminokwasów, dzięki czemu może rosnąć na pożywce nie zawierającej żadnego z nich. Ten nowy szczep bakteryjny pojawia się z prawdopodobieństwem większym niż wynikające z błędów podczas replikacji. Genom nowego szczepu bakterii zawiera normalny gen niezbędny do syntezy leucyny pochodzący z jednego szczepu i normalny gen do syntezy metioniny, pochodzący z drugiego.

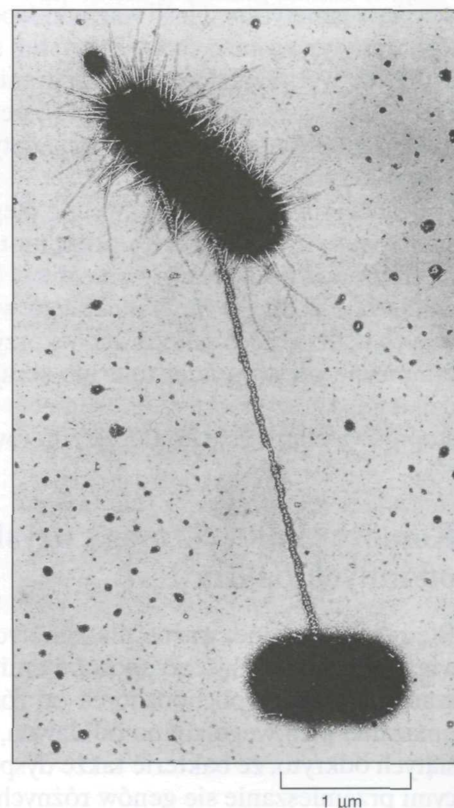
Jak to przedstawimy bardziej szczegółowo w następnym podrozdziale, proces mieszania genów zachodzi w drodze przeniesienia DNA z jednej bakterii do drugiej i zastąpienia niektórych genów w komórce akceptorowej genami zawarymi w przenoszonym DNA. Zastępowanie genów przebiega podczas rekombinacji DNA, zachodzacej między dwiema cząsteczkami DNA o podobnej sekwencji. Przeniesienie genów i następnie rekombinacja stanowi dla bakterii bardzo dobry sposób adaptacji do zmian w środowisku — poprzez możliwie najpełniejsze wykorzystanie zmienności dostępnej w obrębie danej populacji.

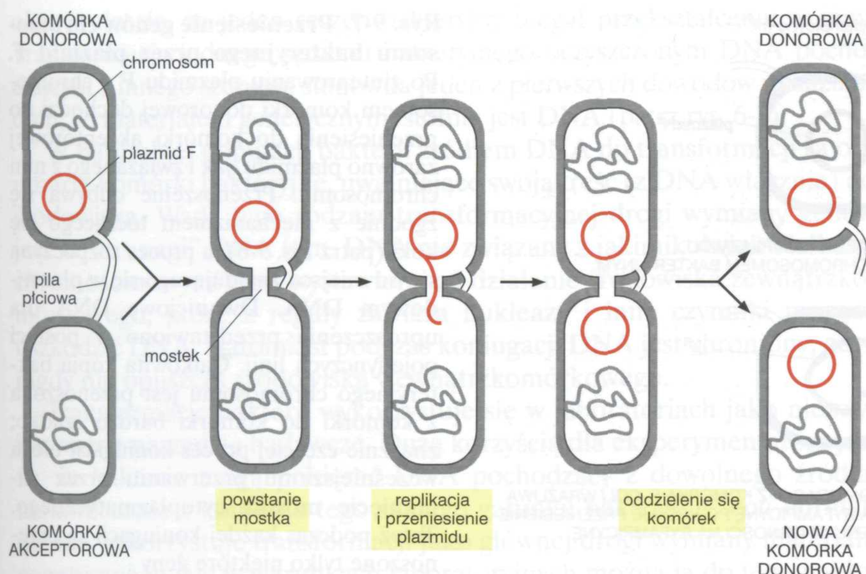
Geny bakteryjne mogą być przenoszone przez koniugację

Geny mogą być przenoszone z jednej komórki bakteryjnej do drugiej kilkoma różnymi sposobami. Jednym z nich jest bezpośrednie przenoszenie genów z komórki do komórki podczas ich *koniugacji*. Nie wszystkie komórki znajdujące się w populacji mogą zainicjować koniugację i przeniesienie genów. Zdolność do koniugacji nadają im geny znajdujące się w **plazmidach** bakteryjnych. Plazmidy są to małe, koliste, dwuniciowe cząsteczki DNA, oddzielne od znacznie większego chromosomu bakteryjnego. Mają swoje własne miejsce początku replikacji, umożliwiające im replikację niezależną od tego chromosomu. Istnieje wiele różnych rodzajów plazmidów, występujących w wielu różnych rodzajach bakterii, ale tylko niektóre z nich są zdolne do zainicjowania koniugacji i przenoszenia DNA. Plazmid, który normalnie inicjuje koniugację *E. coli*, nazywa się *plazmidem* F (ang. fertility — płodność) albo czynnikiem płciowym.

Koniugacja może zachodzić tylko między komórką zawierającą plazmid F a taką, która go nie zawiera. Kiedy bakteria nosząca plazmid F (komórka *donorowa*) napotka bakterię nie zawierającą tego plazmidu (komórkę *akceptorową*), to między tymi dwiema komórkami wytwarza się cytoplazmatyczne połączenie (mostek). DNA plazmidu F ulega replikacji i przeniesieniu od komórki dawcy do komórki akceptorowej przez to połączenie (rys. 9-4, 9-5 i 9-6). Po przeniesieniu DNA połączenie między komórkami zostaje zerwane i teraz obydwie komórki bakteryjne, z których każda zawiera plazmid F, po napotkaniu komórek akceptorowych działają jako komórki donorowe. Plazmid F jest właśnie dlatego potrzebny do

Rys. 9-4. Mikrografia elektronowa dwóch komórek bakteryjnych podczas koniugacji. Komórka donorowa (*u góry*) jest połączona z komórką akceptorową przez pilę płciową (patrz pierwsza część rys. 9-5). Aby lepiej uwidocznić pilę płciową, wyznakowano ją *wirusami*, które specyficznie z nią się wiążą. (Dzięki uprzejmości: Charles C. Brinton Jr., Judith Carnahan)



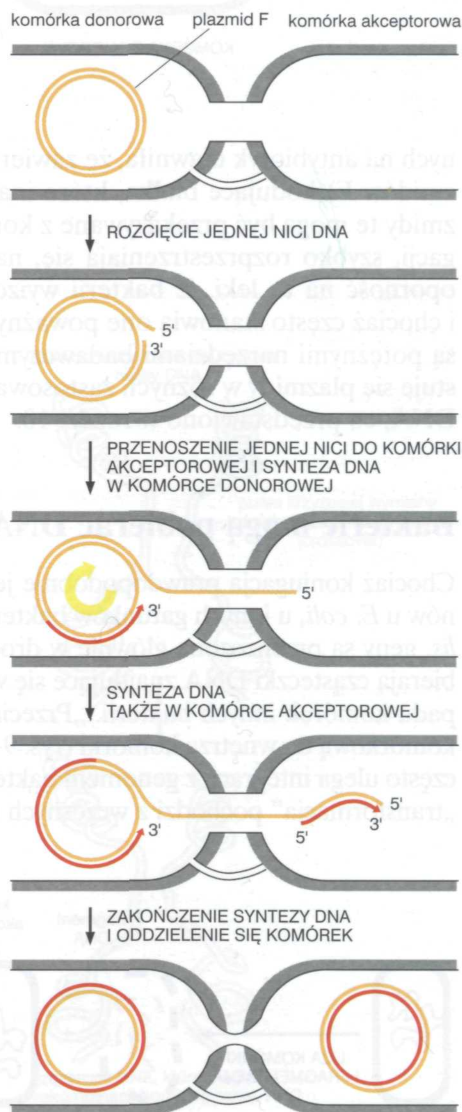


Rys. 9-5. Schemat koniugacji bakterii. Cienka a długa wypustka komórki donorowej, *widocznej po lewej stronie*, jest pilą płciową, służącą do połączenia się komórki donorowej z komórką akceptorową. DNA zostaje przekazany poprzez mostek cytoplazmatyczny, który powstaje po połączeniu się komórek. Po przeniesieniu jednej kopii plazmidu komórki bakteryjne oddzielają się. Zarówno genom bakteryjny, jak i plazmid F są zbudowane z dwuniciowego DNA, jednak dla uproszczenia przedstawiono je tutaj w postaci pojedynczych linii. Niezwykły sposób replikacji plazmidu, określany jako mechanizm toczącego się koła, opisano bardziej szczegółowo na rys. 9-6

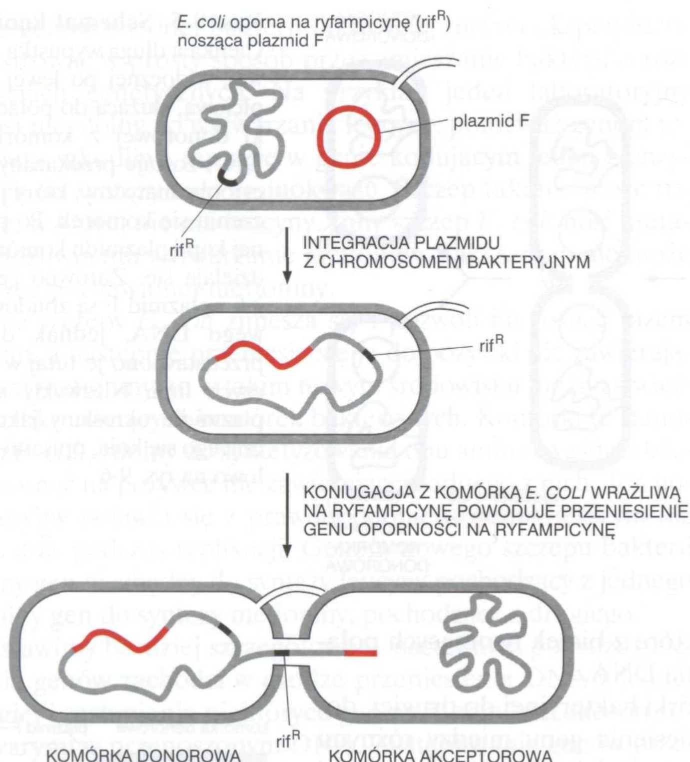
koniugacji, że zawiera geny kodujące niektóre z białek tworzących połączenie (mostek) niezbędne do przeniesienia DNA.

Przenoszenie plazmidu F z jednej komórki bakteryjnej do drugiej, dostarczając najprostszego przykładu przeniesienia genu między różnymi osobnikami, ma jednak ograniczone znaczenie jako źródło zmienności genetycznej. Przeniesieniu ulega tylko niewiele genów zawartych w plazmidzie F i są to w większości geny zaangażowane w proces koniugacji. Plazmid F może jednak czasami stać się integralną częścią chromosomu bakteryjnego przez rodzaj rekombinacji określany jako *integracja*, co omówimy później. Zintegrowany z chromosomem plazmid F wciąż jeszcze może inicjować koniugację i przeniesienie się z jednej komórki do drugiej. Ale wtedy przenoszeniu ulega nie tylko plazmid F, lecz także znaczna część chromosomu bakteryjnego, gdyż te dwie cząsteczki DNA są kowalencyjnie połączone (rys. 9-7). Tym sposobem dosłownie każdy z genów może być przeniesiony z komórki dawcy do komórki biorcy.

Przenoszenie genów zwiększa zmienność genetyczną bakterii, a tym samym ich możliwości dostosowawcze. Jednego z typowych przykładów dostarcza powszechne stosowanie antybiotyków, takich jak penicylina. Pod silnym naciskiem doboru, wynikającym z powszechnego wykorzystywania tego typu leków, szybko powstały szczepy bakteryjne oporne na najpopularniejsze antybiotyki. Na przykład, jedna trzecia nowych izolowanych klinicznie bakterii *Neisseria gonorrhoeae* wywołujących u człowieka rzeżączkę, jest oporna na penicylinę. W rezultacie penicylina nie jest pierwszoliniowym lekiem przeciwko tej chorobie. Analiza bakterii opor-



Rys. 9-6. Synteza i przeniesienie plazmidowego DNA przez replikację według mechanizmu toczącego się koła. Plazmid F ulega replikacji opisywanej jako mechanizm toczącego się koła. Jedna z dwóch nici plazmidowego DNA ulega przecięciu i koniec 5′ przeciętej nici jest kierowany do komórki akceptorowej przez mostek cytoplazmatyczny. Równocześnie rozpoczyna się synteza DNA na otwartym plazmidzie pozostającym w komórce donorowej, wskutek czego powstaje nowy łańcuch DNA, zaznaczony na rysunku kolorem czerwonym. Podczas tego procesu plazmid donorowy obraca (toczy) się, jak zaznaczono *jasnożółtą strzałką*. Po wniknięciu jednoniciowego plazmidowego DNA (kolor *żółty*) do komórki akceptorowej jest syntetyzowana jego druga nić (kolor *czerwony*), komplementarna do pierwszej

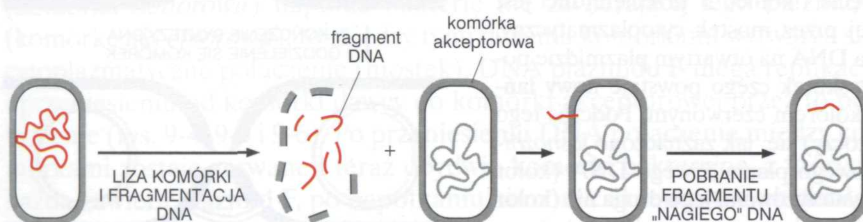


Rys. 9-7. Przeniesienie genów chromosomu bakteryjnego przez plazmid F. Po zintegrowaniu plazmidu F z chromosomem komórki donorowej dochodzi do przeniesienia do komórki akceptorowej zarówno plazmidu, jak i związanego z nim chromosomu. Przenoszenie odbywa się zgodnie z mechanizmem toczącego się koła (patrz rys. 9-6), a proces rozpoczyna się od miejsca znajdującego się w plazmidowym DNA. Dwuniciowe DNA dla uproszczenia przedstawiono w postaci pojedynczych linii. Całkowita kopia bakteryjnego chromosomu jest przenoszona z komórki do komórki bardzo rzadko; znacznie częściej proces koniugacji ulega wcześniejszemu przerwaniu przez zamknięcie mostka cytoplazmatycznego. Toteż podczas każdej koniugacji są przenoszone tylko niektóre geny

nych na antybiotyk ujawniła, że zawierają one plazmidy (podobne do plazmidów F) kodujące białka, które inaktywują antybiotyk. Ponieważ plazmidy te mogą być przekazywane z komórki do komórki w drodze koniugacji, szybko rozprzestrzeniają się, nadając dużym populacjom bakterii oporność na te leki. Z bakterii wyizolowano wiele różnych plazmidów i chociaż często stanowią one poważny problem medyczny, równocześnie są potężnymi narzędziami badawczymi. Na przykład rutynowo wykorzystuje się plazmidy w różnych zastosowaniach rekombinacyjnej technologii DNA, co przedstawiono w rozdz. 10.

Bakterie mogą pobierać DNA ze swego otoczenia

Chociaż koniugacja prawdopodobnie jest główną drogą przekazywania genów u *E. coli*, u innych gatunków bakterii, takich jak glebowy *Bacillus subtilis*, geny są przenoszone głównie w drodze **transformacji**. Bakterie te pobierają cząsteczki DNA znajdujące się w ich otoczeniu, a pochodzące z rozpadu komórek innych bakterii. „Przeciągają” taki DNA przez swoja błonę komórkową do wnętrza komórki (rys. 9-8). Po wniknięciu do komórki DNA często ulega integracji z genomem bakteryjnym przez rekombinację. Termin „transformacja” pochodzi z wczesnych obserwacji tego zjawiska, w których



Rys. 9-8. Transformacja bakterii. Niektóre bakterie mogą pobierać małe fragmenty DNA, pochodzące od innych, nieżywych komórek bakterii. Po wniknięciu do komórki akceptorowej pobrany DNA może stać się częścią genomu biorcy poprzez proces określany jako rekombinacja homologiczna (rys. 9-13)

okazywało się, że jeden szczep bakteryjny ulegał przekształceniu w inny. Transformacja jednego szczepu bakteryjnego oczyszczonym DNA pochodzącym z innego szczepu, stanowiła jeden z pierwszych dowodów wskazujących, że materiałem genetycznym istotnie jest DNA (patrz rys. 6-3).

W naturalnej populacji bakterii źródłem DNA do transformacji są obumarłe komórki bakteryjne, uwalniające swoją treść (z DNA włącznie) do środowiska. Wadą tego rodzaju transformacyjnej drogi wymiany genów jest to, że „nagi" DNA (tzn. DNA nie związany z jakimikolwiek białkami chromosomowymi) jest wystawiony na działanie środowiska zewnątrzkomórkowego, które z reguły zawiera nukleazy i inne czynniki mogące uszkodzić DNA. Natomiast podczas koniugacji DNA jest chroniony, gdyż nigdy nie opuszcza środowiska wewnątrzkomórkowego.

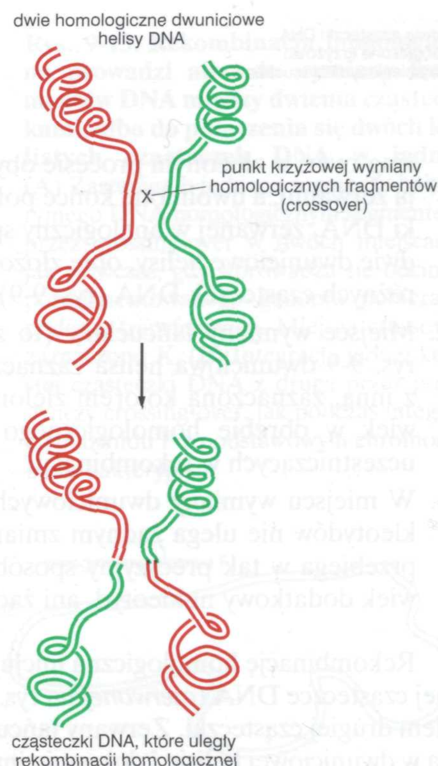
Transformację bakterii wykorzystuje się w laboratoriach jako niezwykle ważne narzędzie badawcze. Dużą korzyścią dla eksperymentatora jest to, że bakterie mogą pobierać DNA pochodzący z dowolnego źródła, niekoniecznie z komórek tego samego gatunku bakterii. *E. coli* normalnie nie wykorzystuje transformacji jako głównej drogi wymiany materiału genetycznego, ale w warunkach laboratoryjnych można ją do tego nakłonić. Jak zobaczymy w rozdz. 10, umożliwia to łatwe prowadzenie w warunkach laboratoryjnych badań DNA pochodzącego ze skomplikowanego organizmu, takiego jak człowiek.

Dwie cząsteczki DNA o podobnej sekwencji nukleotydowej mogą ulec rekombinacji

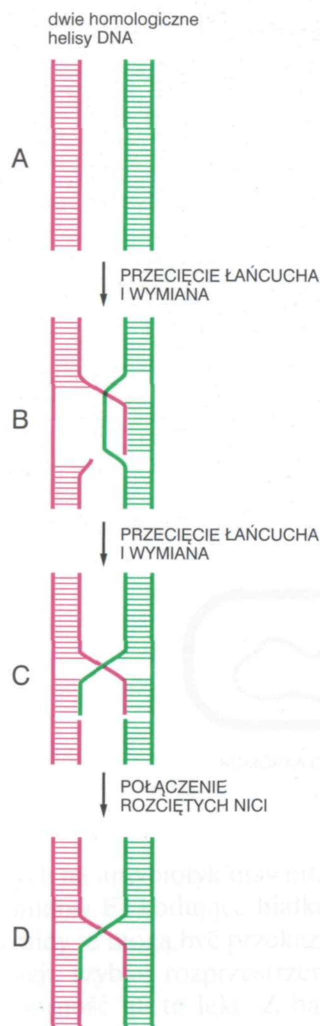
Po dostaniu się — przez koniugację lub transformację — odcinka DNA do wnętrza komórki, jego losy mogą być różne. Jeśli wnikający DNA jest plazmidem, takim jak omówiony plazmid F, to może on ulegać replikacji niezależnie od replikacji genomu swego nowego gospodarza i jest przekazywany potomnym komórkom podczas podziałów bakterii. Jeśli wnikający DNA nie może ulec replikacji ze względu na brak miejsca początku replikacji (*ori*), to ulega przeniesieniu do komórek potomnych tylko wtedy, gdy stanie się częścią chromosomu bakteryjnego. W przeciwnym razie taki DNA w miarę zachodzących podziałów szybko uległby wyeliminowaniu z populacji. Najważniejszą drogą wprowadzania DNA do genomu bakteryjnego jest **rekombinacja homologiczna**.

Rekombinacja homologiczna ma miejsce we wszystkich organizmach i zachodzi pomiędzy jakimikolwiek dwiema dwuniciowymi cząsteczkami DNA, które zawierają rejony o identycznej lub podobnej sekwencji nukleotydowej. Chociaż mechanizmu tego procesu dokładnie nie wyjaśniono, następujące jego cechy, poznane w bakteriach, są prawdopodobnie wspólne dla wszystkich procesów rekombinacji homologicznej:

1. Dwie dwuniciowe cząsteczki DNA zawierające regiony o bardzo podobnej sekwencji (homologiczne) nukleotydów układają się obok siebie w taki sposób, że ich homologiczne odcinki są względem siebie równoległe. Następnie cząsteczki DNA ulegają reakcji zwanej cros-

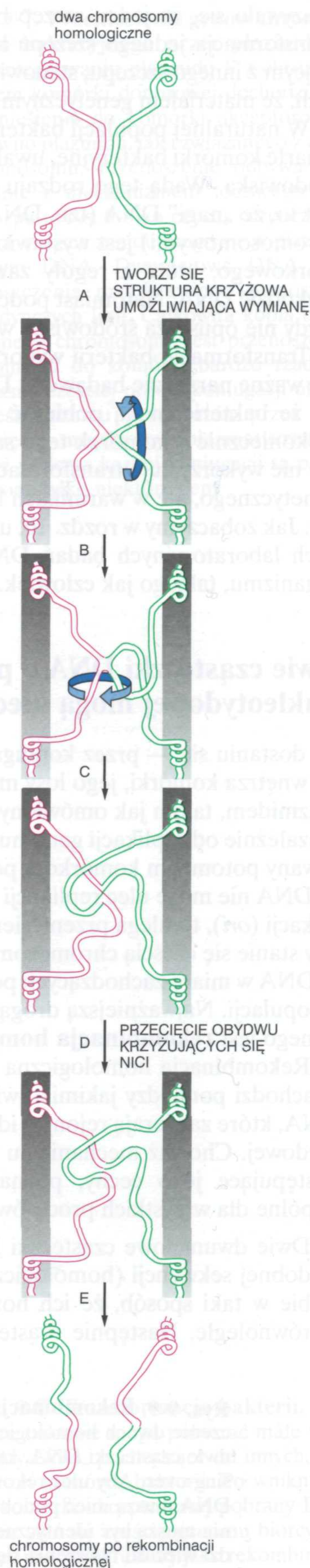


Rys. 9-9. Rekombinacja homologiczna. Zerwanie i ponowne połączenie dwóch homologicznych dwuniciowych cząsteczek DNA tworzy dwie cząsteczki DNA, które uległy procesowi określanemu jako crossing-over. Aby ulec rekombinacji homologicznej, wyjściowe cząsteczki DNA muszą mieć podobne sekwencje nukleotydowe, ale sekwencje te nie muszą być identyczne. Proces rekombinacji homologicznej prowadzi więc do tworzenia się cząsteczek DNA o nowych sekwencjach nukleotydowych



Rys. 9-10. (*po lewej*) **Wymiana nici DNA podczas rekombinacji homologicznej.** (A) Dwie cząsteczki DNA o podobnych sekwencjach układają się obok siebie. (B) Jedna z nici DNA ulega przecięciu i przecięta nić tworzy pary zasad z komplementarną nicią drugiej helisy DNA. (C) Wyparta nić ulega przecięciu i zmienia komplementarnego partnera, wskutek czego krzyżują się dwie nici DNA, pochodzące z dwóch sąsiednich dwuniciowych cząsteczek DNA. (D) Rozcięte łańcuchy ulegają kowalencyjnemu połączeniu z udziałem ligazy DNA. Tworzy się w ten sposób struktura, w której występują dwie nici krzyżujące się i dwie nici nie skrzyżowane. Istnieje kilka możliwych dróg prowadzących od wymiany pojedynczej nici do krzyżowej wymiany odcinków DNA; tutaj przedstawiono tylko jedną z nich

Rys. 9-11. (*po prawej*) **Rotacja w miejscu krzyżowania się łańcuchów ulegających wymianie.** Podczas etapu A tworzy się struktura zawierająca skrzyżowane łańcuchy, jak pokazano to na rys. 9-10. Gdyby nie zaszła rotacja (etapy B i C), zwana również izomeryzacją, to przecięcie dwóch skrzyżowanych nici zakończyłoby ich wymianę i rekombinacja genetyczna nie nastąpiłaby. Jeśli dochodzi do rotacji (etapy B i C), to rozcięcie dwóch krzyżujących się nici prowadzi do utworzenia się dwóch cząsteczek DNA, które dokonały wymiany odcinków DNA (etapy D i E)



sing-over: w złożonym procesie obydwie nici dwuniciowej helisy ulegają zerwaniu, a uwolnione końce połączeniu z końcami drugiej cząsteczki DNA, zerwanej w analogiczny sposób. Odtwarzają się w ten sposób dwie dwuniciowe helisy, obie złożone z części pochodzących od dwóch różnych cząsteczek DNA (rys. 9-9),

2. Miejsce wymiany łańcuchów (to znaczy takie miejsce, w którym na rys. 9-9 dwuniciowa helisa zaznaczona kolorem czerwonym łączy się z inną, zaznaczoną kolorem zielonym) może znajdować się gdziekolwiek w obrębie homologicznego regionu dwóch cząsteczek DNA uczestniczących w rekombinacji.
3. W miejscu wymiany dwuniciowych fragmentów DNA sekwencja nukleotydów nie ulega żadnym zmianom. Zrywanie i ponowne łączenie przebiega w tak precyzyjny sposób, że nie zostaje dołączony jakikolwiek dodatkowy nukleotyd, ani żaden nukleotyd nie ulega eliminacji.

Rekombinację homologiczną inicjuje zerwanie jednego łańcucha w jednej cząsteczce DNA (*czerwonej* na rys. 9-10) odpowiednio ułożonej względem drugiej cząsteczki. Zerwany łańcuch oddysocjowuje od swego partnera w dwuniciowej helisie i dokonuje inwazji innej cząsteczki DNA (*zielonej*

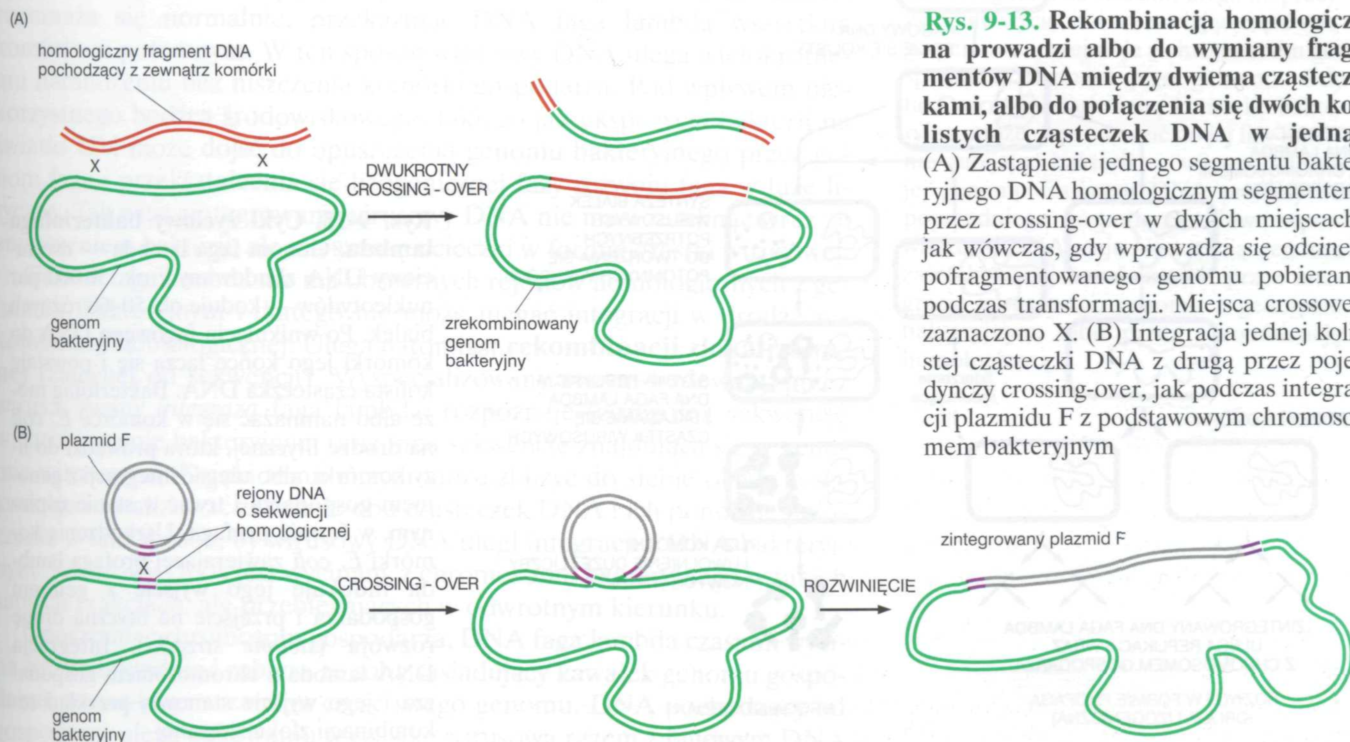


Rys. 9-12. **Mikrografia elektronowa krzyżujących się łańcuchów podczas rekombinacji homologicznej (struktura Hollidaya).** Widoczna na zdjęciu struktura odpowiada etapowi B na rys. 9-11. (Dzięki uprzejmości: Huntington Potter, David Dressler)

na rys. 9-10), która ulega lokalnemu rozpleceniu, dzięki czemu łańcuch dokonujący inwazji może w rozplatanym miejscu (rys. 9-10B) utworzyć pary zasad z łańcuchem komplementarnym. Jest to pierwszy etap reakcji. Teraz zerwaniu ulega łańcuch wyparty z cząsteczki *zielonej* i tworzy komplementarne pary z łańcuchem DNA pierwszej cząsteczki DNA (*czerwonej* na rys. 9-10C). Miejsca zerwania łańcuchów zostają następnie połączone, a dwie cząsteczki DNA są utrzymywane obok siebie fizycznie przez crossing-over jednego łańcucha z każdej cząsteczki (rys. 9-10D). Ten podstawowy intermediat w reakcji rekombinacji homologicznej jest znany jako *połączenie Hollidaya* lub *krzyżowa wymiana łańcuchów*.

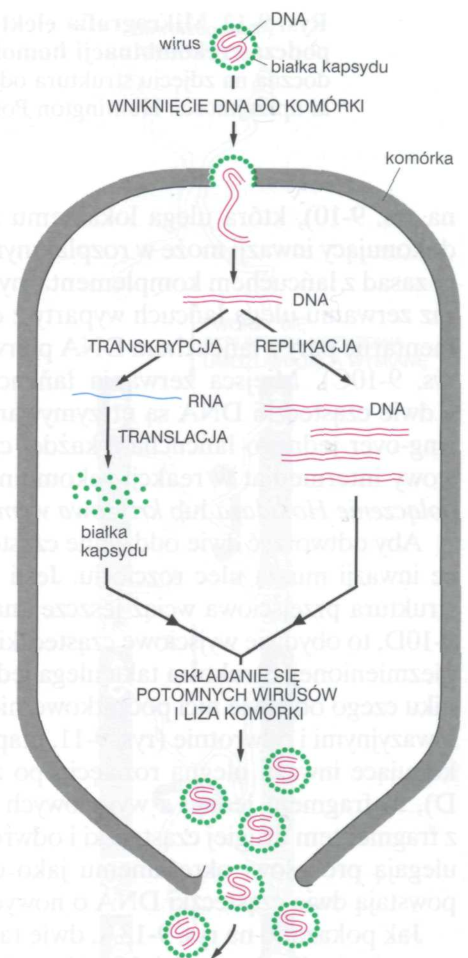
Aby odtworzyć dwie oddzielne cząsteczki DNA, obydwie nici dokonujące inwazji muszą ulec rozcięciu. Jeśli ulegną rozcięciu w momencie, gdy struktura przejściowa wciąż jeszcze znajduje się w postaci pokazanej na rys. 9-10D, to obydwie wyjściowe cząsteczki DNA oddzielą się w postaci prawie niezmienionej. Struktura taka ulega jednak serii ruchów rotacyjnych, w wyniku czego obydwie nici początkowo nie dokonujące inwazji stają się nićmi inwazyjnymi i odwrotnie (rys. 9-11, etapy B i C oraz rys. 9-12). Jeśli nici dokonujące inwazji ulegną rozcięciu po zakończeniu rotacji (rys. 9-11, etap D), to fragment jednej z wyjściowych cząsteczek DNA ulega połączeniu z fragmentem drugiej cząsteczki i odwrotnie; innymi słowy cząsteczki DNA ulegają procesowi określanemu jako crossing-over, w rezultacie którego powstają dwie cząsteczki DNA o nowych sekwencjach (rys. 9-11, etap E).

Jak pokazano na rys. 9-13A, dwie takie wymiany mogą doprowadzić do zastąpienia długiego odcinka bakteryjnego DNA homologicznym, ale nie identycznym fragmentem DNA pochodzącego z innego źródła. Podwójna



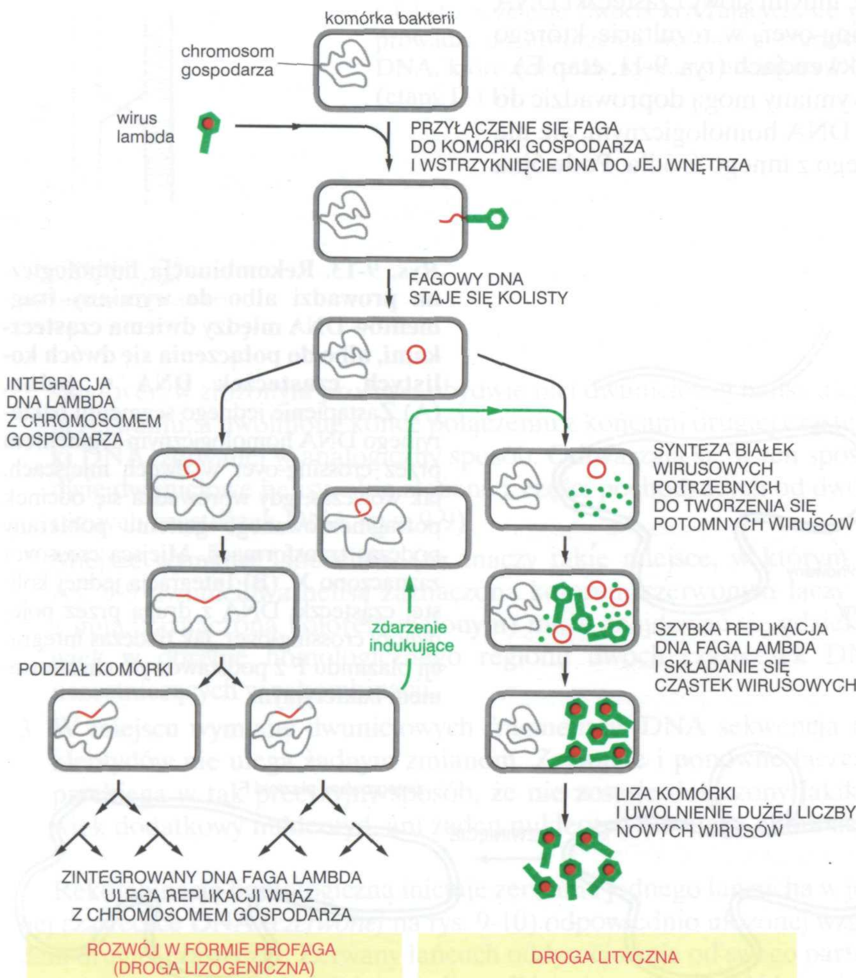
Rys. 9-13. **Rekombinacja homologiczna prowadzi albo do wymiany fragmentów DNA między dwiema cząsteczkami, albo do połączenia się dwóch kolistych cząsteczek DNA w jedną.** (A) Zastąpienie jednego segmentu bakteryjnego DNA homologicznym segmentem przez crossing-over w dwóch miejscach, jak wówczas, gdy wprowadza się odcinek pofragmentowanego genomu pobierany podczas transformacji. Miejsca crossover zaznaczono X. (B) Integracja jednej kolistej cząsteczki DNA z drugą przez pojedynczy crossing-over, jak podczas integracji plazmidu F z podstawowym chromosomem bakteryjnym

Rys. 9-14. Cykl życiowy hipotetycznego wirusa. Przedstawiony na tym rysunku prosty wirus zawiera genom w postaci małej cząsteczki dwuniciowego DNA, kodującego tylko jednego rodzaju białko kapsydu. Żaden ze znanych wirusów nie jest aż tak prosty. Aby ulec replikacji, genom wirusowy musi wniknąć do wnętrza komórki. Następnie zachodzi replikacja wirusowego DNA, co prowadzi do uzyskania wielu jego kopii. Równocześnie niektóre cząsteczki wirusowego DNA ulegają transkrypcji, a utworzony RNA — translacji i powstają białka kapsydu. Zreplikowane cząsteczki wirusowego DNA oraz białka wirusowe spontanicznie składają się, tworząc nowe, potomne cząstki wirusowe



wymiana tego rodzaju jest sposobem wyprowadzenia na stałe segmentu DNA z jednej komórki bakteryjnej do genomu drugiej, niezależnie od tego, czy przeniesienie DNA odbywa się przez koniugację (patrz rys. 9-7) czy przez transformację (patrz rys. 9-8).

Integracja plazmidu F z chromosomem komórki gospodarza (patrz rys. 9-7) także zachodzi poprzez rekombinację homologiczną. Plazmid F zawiera krótki odcinek DNA, którego sekwencja nukleotydów jest bardzo podobna do sekwencji niektórych odcinków chromosomu bakteryjnego. Homologiczna rekombinacja w jednym z tych miejsc wystarczy do zintegrowania kolistej cząsteczki plazmidu F z kolistym chromosomem bakterii (patrz rys. 9-13 B).



Rys. 9-15. Cykl życiowy bakteriofaga lambda. Genom faga lambda — dwuniciowy DNA zbudowany z ok. 50 000 par nukleotydów — koduje ok. 50–60 różnych białek. Po wniknięciu fagowego DNA do komórki jego końce łączą się i powstaje kolista cząsteczka DNA. Bakteriofag może albo namnażać się w komórce *E. coli* na drodze litycznej, która prowadzi do lizy komórki, albo ulegać integracji z genomem gospodarza i trwać w stanie uśpionym, w formie profaga. Uszkodzenie komórki *E. coli* zawierającej profaga lambda indukuje jego wyjście z genomu gospodarza i przejście na lityczną drogę rozwoju (*zielone strzałki*). Integracja DNA lambda z chromosomem gospodarza i jego wyjście stanowią przykład rekombinacji zlokalizowanej

Do przeprowadzenia rekombinacji homologicznej komórki wykorzystują wyspecjalizowane białka, które nacinają DNA, katalizują wymianę nici i rozcinają struktury Hollidaya. Enzymy te są dobrze scharakteryzowane w przypadku bakterii, ale w komórkach eukariotycznych dopiero zaczynamy je poznawać.

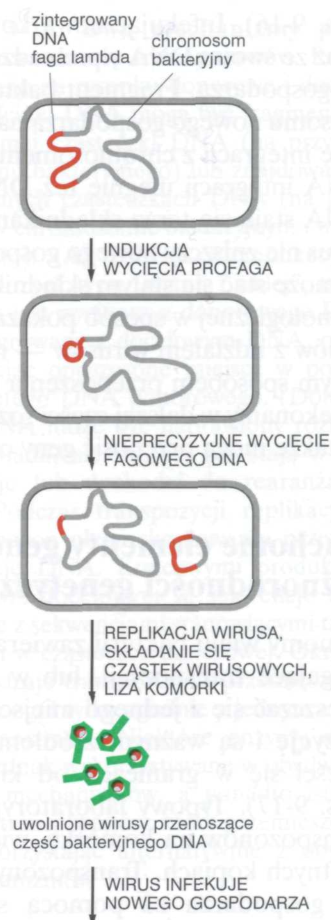
Wirusy bakteryjne mogą przenosić geny między bakteriami

Trzecią drogą przenoszenia genów między komórkami bakteryjnymi są wirusy. Sposób infekowania komórek ssaków przez wirusy omówimy w dalszej części tego rozdziału. Teraz zajmiemy się wirusami atakującymi komórki bakteryjne, czyli *bakteriofagami*, które rozmnażając się wewnątrz komórki bakteryjnej wykorzystują biochemiczny aparat komórki gospodarza do wytworzenia nowych kopii wirusowego genomu i do syntezy białek kapsydu wirusa (rys. 9-14). Namnażanie się wirusa jest dla zainfekowanej komórki z reguły letalne — w rezultacie infekcji komórka ulega lizie, uwalniając potomne wirusy zdolne do zainfekowania sąsiednich komórek bakteryjnych. Jednak niektóre bakteriofagi infekując komórki bakteryjne nie ulegają natychmiast namnażaniu prowadzącemu do dużej ilości potomnych cząstek wirusowych, ale wchodzą w stan uśpienia (latencji): ich genomy są w komórce w stanie nieaktywnym i nie dochodzi do powstawania potomnych wirusów.

Najlepiej poznanym przykładem takich wirusów jest bakteriofag lambda (λ), którego niewielki genom stanowi dwuniciowa cząsteczka DNA. Po zainfekowaniu *E. coli* przez faga lambda zwykle dochodzi do jego namnażania i wytworzenia kilkuset nowych wirusów, uwalnianych przez lizę (rozpad) komórki bakteryjnej — sytuacja taka to *infekcja lityczna*. Znacznie rzadziej genom faga lambda ulega integracji z kolistym chromosomem *E. coli* (rys. 9-15). Zintegrowany DNA faga nazywa się *profagiem* i znajduje się w chromosomie bakteryjnym spoczynkowym. Taki tryb bytowania faga określamy jako tryb *lizogeniczny*. Zainfekowana bakteria rozmnaża się normalnie, przekazując DNA faga lambda wszystkim komórkom potomnym. W ten sposób wirusowy DNA ulega wielokrotnemu namnożeniu bez niszczenia komórki gospodarza. Pod wpływem niekorzystnego bodźca środowiskowego, takiego jak ekspozycja bakterii na światło UV, może dojść do opuszczenia genomu bakteryjnego przez genom faga i przekształcenia się lizogenicznej fazy rozwoju faga w fazę lityczną. Tak więc zintegrowany wirusowy DNA nie musi zaniknąć wraz ze zniszczeniem bakterii, ale ma szansę ucieczki w formie cząstki wirusowej.

Genom faga lambda nie ma obszernych rejonów homologicznych z genomem bakteryjnym i dlatego nie może ulegać integracji w drodze rekombinacji homologicznej. Ulega natomiast **rekombinacji zlokalizowanej** (zależnej od sekwencji). Wyspecjalizowany enzym kodowany przez wirusa, zwany *integrazą* faga lambda, rozpoznaje szczególną sekwencję w chromosomie bakteryjnym oraz inną sekwencję znajdującą się w genomie wirusowym. Dzięki temu enzym może zbliżyć do siebie obydwie sekwencje i katalizować zerwanie obu cząsteczek DNA i ich ponowne połączenie w taki sposób, by wirusowy DNA uległ integracji z DNA bakteryjnym. Wirusowy DNA jest wycinany z chromosomu bakteryjnego w takich samych reakcjach, ale przebiegających w odwrotnym kierunku.

Opuszczając chromosom gospodarza, DNA faga lambda czasami wycina się niedokładnie i zabiera ze sobą sąsiadujący kawałek genomu gospodarza, zostawiając w zamian część swego genomu. DNA pochodzący od gospodarza ulega pakowaniu w cząstkę wirusową razem z fagowym DNA



Rys. 9-16. Przeniesienie DNA z jednej bakterii do drugiej w drodze transdukcji. Opuszczając chromosom gospodarza fag lambda czasami ulega nieprecyzyjnemu wycięciu i zostawiając część swego genomu, przejmuje z chromosomu gospodarza fragment jego genomu. Gdy taki wirus infekuje inną komórkę bakteryjną, może doprowadzić do jej lizy lub — nie zabijając bakterii — wprowadzić do jej genomu fragment DNA przejęty od poprzedniego gospodarza. Nowo wprowadzony DNA staje się częścią genomu zainfekowanej komórki albo przez integrację wirusowego genomu z genomem bakteryjnym, albo przez rekombinację homologiczną

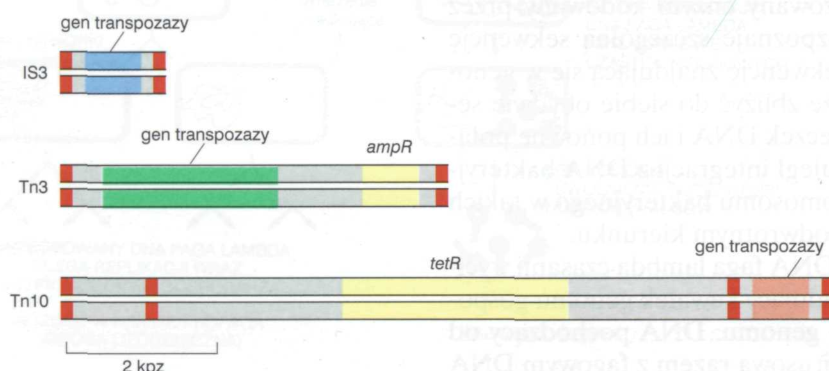
(rys. 9-16). Infekując nową komórkę gospodarza, zmieniony fag lambda wraz ze swoim DNA wprowadza do niej DNA pochodzący od poprzedniego gospodarza. Fragment bakteryjnego DNA może stać się częścią chromosomu nowego gospodarza na kilka sposobów. Jeśli wchodzący wirus ulegnie integracji z chromosomem nowego gospodarza, to wraz z wirusowym DNA integracji ulegnie też DNA będący „pasażerem" i obydwa rodzaje DNA stają się teraz składnikami nowego chromosomu. Jeżeli wchodzący wirus nie zniszczy nowego gospodarza, to DNA przenoszony w roli pasażera może stać się stałym składnikiem nowej komórki w trybie rekombinacji homologicznej w sposób pokazany na rysunku 9-13A. Proces przenoszenia genów z udziałem wirusów — nazywany **transdukcją** — jest więc jeszcze innym sposobem przenoszenia genów z jednej bakterii do drugiej. Jak się przekonamy w dalszej części rozdziału, wirusy zakażające komórki zwierzęce także mogą przenosić geny chromosomowe w drodze transdukcji.

Pytanie 9-3. Tworząc profaga, fag lambda integruje swój genom zawsze w tym samym miejscu chromosomu bakteryjnego. Jak wpływa to na zakres genów bakteryjnych, które fag lambda może upakować w cząstkę wirusową (patrz rys. 9-16)?

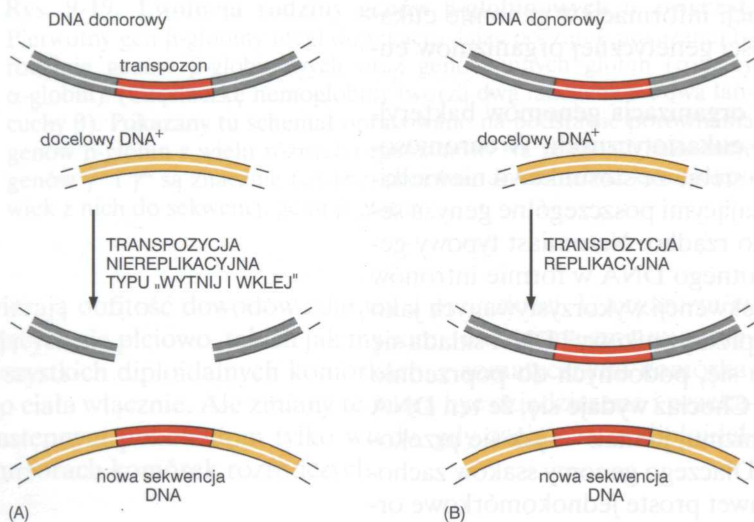
Ruchome elementy genetyczne są źródłem różnorodności genetycznej

Genomy wielu bakterii zawierają odcinki DNA określane jako elementy ulegające transpozycji, lub w skrócie **transpozony**, które mogą przemieszczać się z jednego miejsca na drugie w chromosomie przez **transpozycję** i są ważnym źródłem różnorodności genetycznej. Ich długość mieści się w granicach od kilkuset do dziesiątków tysięcy par zasad (rys. 9-17). Typowy laboratoryjny szczep *E. coli* zawiera 10–20 różnych transpozonów na komórkę, wiele z nich występuje w genomie w wielokrotnych kopiach. Transpozony przemieszczają się w obrębie DNA swego gospodarza za pomocą specjalnych enzymów rekombinacyjnych (*transpozaz*) kodowanych przez transpozony (rys. 9-18). Transpozony można uważać za małe pasożyty, ukryte w chromosomach komórek. Te ruchome elementy genetyczne decydują jednak o kilku cechach, korzystnych dla komórek bakteryjnych. Na przykład niektóre transpozony zawierają promotory transkrypcyjne, które umiejscawiając się w pobliżu jakichś genów, mogą wpływać na poziom ich ekspresji lub na zmianę warunków kontrolowania genu przez komórkę.

Transpozony występujące w wielu kopiach stwarzają ponadto możliwości rearanżacji genomów bakteryjnych poprzez rekombinację homologiczną między poszczególnymi kopiami transpozonów. Na przykład integracja plazmidu F z genomem *E. coli* (patrz rys. 9-13B) zachodzi przez rekombinację homologiczną między jedną kopią sekwencji DNA transpozonu zlokalizowanego na plazmidzie i drugą kopią, znajdującą się w chromosomie bakteryjnym. Niektóre transpozony zawierają też geny oporności na antybiotyki (patrz rys. 9-17). Takie transpozony mogą przemieszczać się



Rys. 9-17. Trzy spośród wielu rodzajów poznanych transpozonów bakteryjnych. Każdy z tych transpozonów zawiera gen kodujący transpozazę — enzym, który przeprowadza reakcje rozcinania DNA i ponownego jego łączenia, konieczne do przemieszczania się transpozonu. W każdym transpozonie są też sekwencje DNA (zaznaczone kolorem *czerwonym*), które rozpoznaje tylko transpozaza przez niego kodowana, niezbędne do przemieszczania się transpozonu. Niektóre transpozony dodatkowo zawierają geny kodujące enzymy zdolne do inaktywacji antybiotyków, takich jak ampicylina (*ampR*) i tetracyklina (*tetR*). Przypuszcza się, że transpozon Tn10 powstał przez przypadkowe wbudowanie się do chromosomu dwóch krótkich transpozonów po obu stronach genu oporności na tetracyklinę



Rys. 9-18. Dwa mechanizmy przemieszczania się transpozonów. Przedstawione na rysunku donorowe i docelowe odcinki DNA mogą być fragmentami tej samej cząsteczki DNA (na przykład genomu bakteryjnego) lub znajdować się w różnych cząsteczkach DNA (na przykład w chromosomie bakteryjnym i w plazmidzie). (A) Podczas niereplikacyjnej transpozycji typu „wytnij i wklej", transpozon jest wycinany z donorowego DNA i integrowany z docelowym DNA, pozostawiając opuszczone miejsce w postaci rozciętego DNA donorowego. (Donorowy DNA może być naprawiony różnymi sposobami, ale czasem powstają w nim delecje lub dochodzi do rearanżacji). (B) Podczas transpozycji replikacyjnej transpozon ulega skopiowaniu przez replikację DNA. Końcowymi produktami w DNA docelowym są sekwencje identyczne z sekwencjami stanowiącymi transpozon w cząsteczce donorowej. Określone rodzaje transpozonów przemieszczają się na ogół tylko zgodnie z jednym z tych mechanizmów. Niektóre enzymy mogą być jednak wykorzystywane w obydwu typach mechanizmów, a ponadto istnieje kilka transpozonów, które przemieszczają się korzystając alternatywnie z obydwu mechanizmów

z chromosomu do plazmidów, które następnie mogą być przeniesione do innych bakterii w drodze koniugacji. Przypuszcza się, że właśnie w ten sposób powstały liczne plazmidy zawierające geny oporności na antybiotyki, które obecnie znajdują się w wielu klinicznie ważnych bakteriach. Ruchome elementy genetyczne występują także w genomach organizmów eukariotycznych (pierwsze elementy tego typu wykryto w latach pięćdziesiątych właśnie w kukurydzy), wrócimy do nich w dalszej części tego rozdziału.

Widzimy więc, że pomimo dużej wierności, z jaką bakterie replikują swój DNA i przekazują następnym pokoleniom, genomy bakteryjne są w stanie pewnej płynności. Dochodzi do gromadzenia się mutacji, geny są przenoszone z jednej bakterii do drugiej, genomy wirusowe wnikają do genomu bakteryjnego i opuszczają go, a transpozony zmieniają miejsce. Większość tych zmian dla pojedynczych komórek bakteryjnych jest szkodliwa i takie komórki szybko ulegają eliminacji z populacji bakterii (umierają). Ponieważ jednak bakterie przemieszczają się z jednego środowiska do drugiego, w którym działają inne czynniki selekcyjne, warianty genetyczne okazują się ważne (na przykład dla pozyskiwania składników odżywczych) i w rezultacie poszczególne komórki lepiej dostosowane do zmienionych warunków mogą szybciej rozmnażać się i pojawić jako typ dominujący. Szczególnie ważne i przykre są konsekwencje tej zasady dla medycyny, gdyż te zdolności adaptacyjne umożliwiły uodpornienie się chorobotwórczych bakterii na wiele antybiotyków opracowanych w dwudziestym wieku.

Jest rzeczą oczywistą, że zdolność bakterii do adaptacji genetycznej stanowi ich podstawową właściwość i należy ją brać pod uwagę opracowując przyszłe strategie walki z chorobami zakaźnymi. W następnej części tego rozdziału przekonamy się, że w komórkach eukariotycznych działają podobne mechanizmy zmienności genetycznej, które w istotny sposób warunkowały i nadal warunkują ewolucję życia na naszej planecie.

Źródła zmian genetycznych w genomach eukariotycznych

Przekonaliśmy się, że *Prokaryota* i *Eukaryota* wykazują wiele jednakowych właściwości genetycznych, w tym jednakowy kod genetyczny, takie same podstawowe mechanizmy transkrypcji i translacji oraz wiele jednakowych podstawowych strategii replikacji DNA i jego naprawy. W tym podroz-

dziale przedstawimy, jak sposób organizacji informacji w genomie eukariotycznym przyczynia się do różnorodności genetycznej organizmów eukariotycznych.

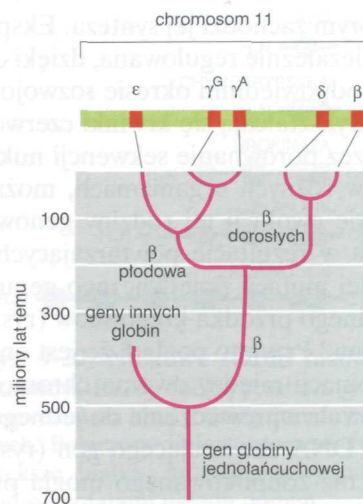
Jak pokrótce wspomniano w rozdz. 7, organizacja genomów bakteryjnych jest znacznie prostsza niż genomów eukariotycznych. W chromosomach bakteryjnych geny są ułożone blisko siebie ze stosunkowo niewielkimi odcinkami „przerywnikowymi" oddzielającymi poszczególne geny, a sekwencje intronowe występują tylko bardzo rzadko. Natomiast typowy genom ssaków zawiera ogromną ilość nieistotnego DNA w formie intronów (omówionych w rozdz. 7) i dodatkowych sekwencji wykorzystywanych jako „przerywniki" pomiędzy genami. Często „przerywnikowy" DNA składa się z różnego typu sekwencji powtarzających się, podobnych do poprzednio omówionych transpozonów bakteryjnych. Chociaż wydaje się, że ten DNA nie koduje niczego przydatnego dla organizmu, jednak — jak się przekonamy — jego obecność ma ważne skutki. Dlaczego genomy ssaków zachowują ten dodatkowy DNA? Bakterie, a nawet proste jednokomórkowe organizmy eukariotyczne, takie jak drożdże, na ogół znajdują się pod silnym naciskiem doboru zmuszającym je do podziałów z maksymalną szybkością, na jaką pozwalają zasoby pokarmowe w ich środowisku i tym samym do minimalizacji ilości dodatkowego DNA w ich genomie, gdyż replikacja DNA jest kosztowna pod względem zasobów energetycznych i materiałowych komórki. Podziały dużych komórek, a szczególnie komórek w organizmach wielokomórkowych, zachodzą znacznie rzadziej, a zasoby pokarmowe zwykle nie są czynnikiem ograniczającym. Nacisk doboru działający w kierunku eliminacji nieistotnych sekwencji DNA nie jest dlatego zbyt duży. Jest to jeden z przypuszczalnych powodów, dla których takie sekwencje mogły gromadzić się w genomach wyższych eukariotów.

Inną cechą odróżniającą genomy eukariotyczne od prokariotycznych są liczne *duplikacje genów* w czasie ewolucji. Rezultatem tego jest występowanie w eukariotycznych genomach wielu dużych rodzin spokrewnionych genów. W genomie haploidalnym (to jest gdy rozpatrujemy tylko jeden z dwóch zestawów chromosomów znajdujących się w komórkach somatycznych) znajdują się geny wielokrotne większości białek, kodujące trochę tylko różne warianty białek lub kodujące białka o mniejszym pokrewieństwie, które mogą pełnić odmienne funkcje.

Komórki organizmów eukariotycznych (z wyjątkiem komórek rozrodczych) są diploidami, tzn. zawierają po dwie kopie każdego genu z wyjątkiem genów zawartych w chromosomach płciowych. Kopie te nie muszą być identyczne. W zasadzie człowiek ma dwie alternatywne formy (allele) każdego z genów. Na przykład może mieć dwa geny normalnej β-globiny lub jeden gen normalnej β-globiny i jeden gen β-globiny sierpowatej, przy czym osobnicy noszący różne wersje genu wykazują większą odporność na malarię niż osoby z dwoma normalnymi allelami. Istotnie pula genów — czyli pełna kolekcja wszystkich alleli wszystkich genów występujących w danym gatunku jako całości — w populacji ludzkiej jest ogromna.

Genomy dziś żyjących organizmów zawierają wiele zapisów zmian genetycznych, którym ulegały w przeszłości, i dzięki starannej analizie sekwencji DNA można te zmiany odczytać. Obecnie znane są sekwencje setek milionów nukleotydów DNA z różnych organizmów i zaczynamy rozumieć, w jaki sposób poszczególne geny i całe genomy ewoluowały przez miliardy lat, które minęły od czasu pojawienia się pierwszej komórki eukariotycznej. Dodatkowymi wskazówkami dotyczącymi mechanizmów procesów ewolucyjnych w przeszłości są zmiany aktualnie zachodzące w chromosomach współczesnych organizmów.

W tym podrozdziale zajmiemy się niektórymi mechanizmami zmian genetycznych wielokomórkowych eukariotów, których duże i złożone ge-



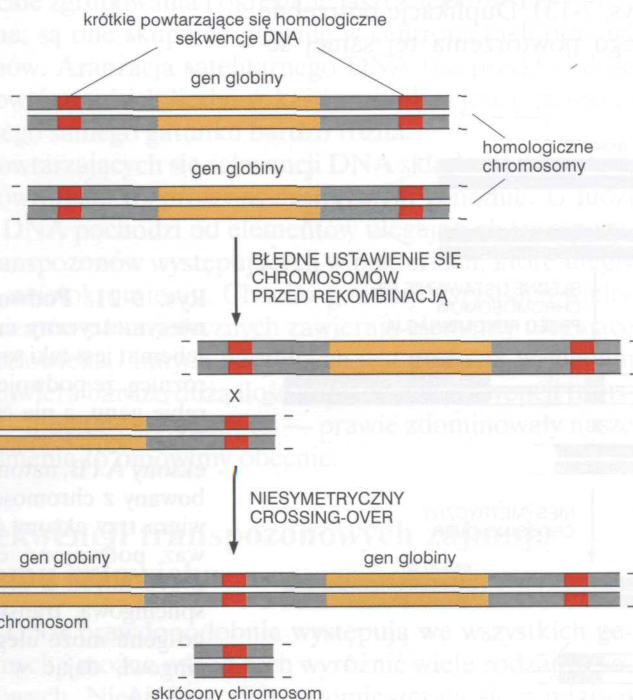
Rys. 9-19. Ewolucja rodziny genów β-globinowych u zwierząt. Pierwotny gen β-globiny uległ duplikacji, dając początek pokazanej tu rodzinie genów β-globinowych oraz genów innych globin (rodziny α-globin). (Cząsteczkę hemoglobiny tworzą dwa łańcuchy α i dwa łańcuchy β). Pokazany tu schemat opracowano na podstawie porównania genów β-globin z wielu różnych organizmów. Na przykład, sekwencje genów γ^G i γ^A są znacznie bardziej podobne do siebie niż któregokolwiek z nich do sekwencji genu β-globiny

nomy zawierają obfitość dowodów zdarzeń z przeszłości. U organizmów *rozmnażających się płciowo, takich jak my sami, omawiane zmiany występują we wszystkich diploidalnych komórkach, z somatycznymi komórkami naszego ciała włącznie. Ale zmiany te mogą być dziedziczone i przekazywane następnym pokoleniom tylko wtedy, gdy zachodzą w diploidalnych prekursorach komórek rozrodczych.*

Rodziny pokrewnych genów powstają przez przypadkowe duplikacje DNA

Jak już wspomniano, genomy eukariotyczne zawierają wiele rodzin pokrewnych genów. Na przykład, w różnych komórkach mięśniowych i niemięśniowych syntetyzowane są różne formy aktyny, białka stanowiącego część aparatu kurczliwego komórek mięśni i występującego w cytoszkielecie (omówiono to w rozdz. 16); różne opsyny — białka wrażliwe na światło o różnej długości fali — są syntetyzowane w różnych komórkach siatkówki; różne geny kolagenu ulegają ekspresji w rozmaitych typach tkanki łącznej itd.

Jedną z najlepiej poznanych *rodzin genowych* jest rodzina genów β-globiny. Genom człowieka zawiera ogółem pięć genów β-globinowych. Geny te kodują podjednostki różnych hemoglobin, wytwarzanych podczas różnych okresów życia zarodkowego, płodowego i dorosłego. Hemoglobiny te wykazują nieco odmienną zdolność wiązania i uwalniania tlenu, a każda z nich jest szczególnie dobrze dostosowana do tego okresu rozwoju,



Rys. 9-20. Podwojenie genów przez niesymetryczny crossing-over. Para homologicznych chromosomów w prekursorowej komórce linii zarodkowej ulega rekombinacji w miejscu krótkiej sekwencji (zaznaczonej kolorem *czerwonym*), powtarzającej się na każdym z chromosomów. W niektórych przypadkach, jak się przypuszcza, sekwencje te są transpozonami, które w genomie człowieka występują w wielokrotnie powtórzonych kopiach. Po rekombinacji jeden z chromosomów ulega wydłużeniu i zawiera dwie kopie genu globiny, drugi ulega skróceniu i zostaje pozbawiony tego genu. Niezależne mutacje w każdym z tych genów, mogące zachodzić w następnych pokoleniach, doprowadziły do ich zróżnicowania. (Ponieważ skrócony chromosom nie zawiera genu globinowego, osobniki dziedziczące ten chromosom zostały wyeliminowane z populacji)

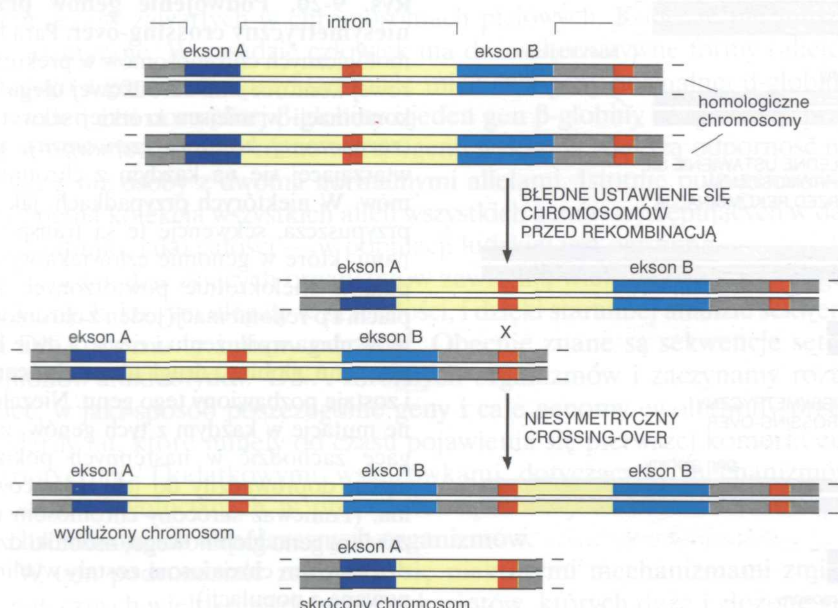
w którym zachodzi jej synteza. Ekspresja każdego z odpowiednich genów jest niezależnie regulowana, dzięki czemu każdy z nich ulega ekspresji tylko w odpowiednim okresie rozwojowym i tylko w tych komórkach, z których wykształcają się krwinki czerwone.

Przez porównanie sekwencji nukleotydowych i aranżacji genów β-globiny w różnych organizmach, można było szczegółowo zrekonstruować historię ewolucji tej rodziny genów. Rodzina genów β-globinowych powstała w rezultacie powtarzających się rund duplikacji i następujących później mutacji pojedynczego genu, który występował już w organizmie wspólnego przodka kręgowców (rys. 9-19). Jak jednak doszło do duplikacji genu? Przyjęto pogląd, że jest ona wynikiem rzadko zdarzającej się rekombinacji między dwoma chromosomami homologicznymi, która spowodowała wprowadzenie do jednego z dwóch chromosomów dodatkowej kopii DNA zawierającego gen (rys. 9-20). Homologiczna rekombinacja genu raz zduplikowanego mogła prowadzić do powstania dodatkowych jego kopii lub do delecji którejś kopii z powstałego zestawu — przez powtarzanie tego samego mechanizmu.

Geny kodujące nowe białka mogą powstawać przez rekombinację eksonów

Nowe geny tworzyły się w toku ewolucji także przez duplikację krótkich sekwencji DNA kodujących poszczególne domeny białek. Wiele białek eukariotów składa się z zestawu powtarzalnych, dających się wyróżnić podobnych obszarów strukturalnych, czyli domen białkowych. Do białek takich należą na przykład immunoglobuliny (patrz rys. 5-25) i albuminy oraz większość białek fibrylarnych, takich jak kolagen. Białka te są kodowane przez geny, które wyewoluowały w drodze powtarzających się duplikacji pojedynczej sekwencji DNA w obrębie genu. Często w genach tego rodzaju każda poszczególna domena białkowa jest kodowana przez odrębny ekson.

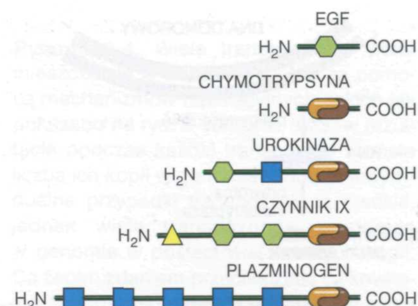
Przypuszcza się, że zachodzącą w ten sposób ewolucję nowych białek znacznie ułatwia organizacja sekwencji kodujących eukariotycznego DNA w postaci szeregu stosunkowo krótkich eksonów, porozdzielanych długimi niekodującymi intronami (patrz rys. 7-13). Duplikacje potrzebne do utworzenia jednego genu zawierającego powtórzenia tej samej se-



Rys. 9-21. Podwojenie eksonu przez niesymetryczny crossing-over. Ogólny schemat jest taki sam jak na rys. 9-20, z tą różnicą, że podwojeniu ulega ekson w obrębie genu, a nie cały gen. Informacyjny RNA wyjściowego genu zawiera dwa eksony A i B, natomiast mRNA transkrybowany z chromosomu wydłużonego zawiera trzy eksony (A, B oraz B). Ponieważ podwojone eksony są połączone przez intron z nienaruszoną sekwencją splicingową, transkrypt zmodyfikowanego genu może ulegać poprawnemu splicingowi, dając w efekcie funkcjonalny mRNA

kwencji mogą zachodzić przez niesymetryczny crossing-over gdziekolwiek w obrębie długich intronów, po dowolnej stronie eksonu kodującego domenę białkową (rys. 9-21). Bez intronów byłoby w oryginalnym genie bardzo mało takich miejsc, w których rekombinacyjna wymiana między homologicznymi chromosomami mogłaby doprowadzić do duplikacji jakiejś domeny bez jej zniszczenia. Dlatego introny znacznie zwiększają prawdopodobieństwo utworzenia się funkcjonalnych genów (kodujących funkcjonalne białka) w drodze duplikacji pewnych rejonów DNA.

Z takich samych powodów obecność intronów znacznie zwiększa prawdopodobieństwo utworzenia się, w przypadkowym akcie rekombinacji, funkcjonalnych hybrydowych genów przez połączenie się początkowo odrębnych eksonów, kodujących zupełnie odmienne domeny białkowe. Rezultaty tego rodzaju przypuszczalnych rekombinacji można obserwować w wielu współczesnych białkach, utworzonych z wielu różnych domen białkowych, z których wiele występuje także w innych białkach (rys. 9-22). Ten ewolucyjny proces jest znany jako **tasowanie eksonów**. Wydaje się, że wszystkie białka kodowane przez genom człowieka (ok. 60 000 białek) powstały w rezultacie tasowania zaledwie kilku tysięcy różnych eksonów, z których każdy koduje domenę białkową złożoną z 30–50 aminokwasów.



Rys. 9-22. Niektóre skutki tasowania eksonów. Każdy rodzaj symbolu graficznego oznacza inną rodzinę domen białkowych. Połączone liniowo domeny tworzą większe białka, których nazwy podano nad schematami układu domen

Duża część DNA wielokomórkowych eukariotów składa się z powtarzających się sekwencji niekodujących

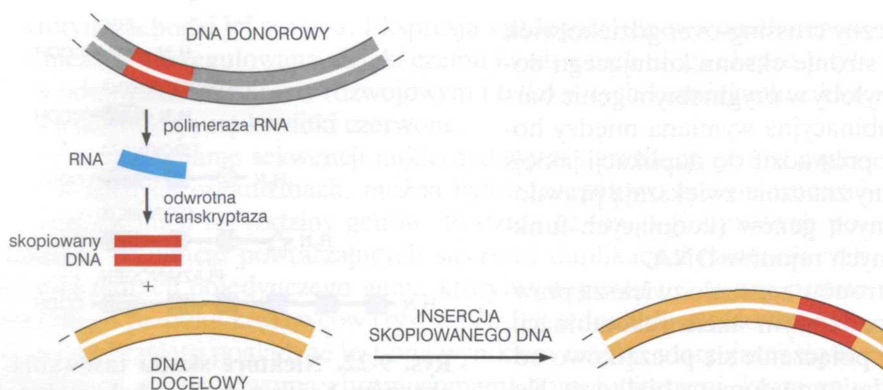
Genomy wielokomórkowych eukariotów zawierają nie tylko introny, lecz także dużą ilość innych pozornie nieistotnych sekwencji. Większość tych sekwencji nie koduje żadnych białek i nawet nie ulega transkrypcji.

Około 70% genomu człowieka stanowią tak zwane unikatowe sekwencje DNA. Obejmują one DNA kodujący białka i większość rodzajów RNA, a także introny. Pozostałe 30% zawiera jednak sekwencje nukleotydowe wielokrotnie powtórzone w genomie. Większość powtarzających się sekwencji nie koduje białek i może być zakwalifikowana do dwóch typów sekwencji. Około jednej trzeciej stanowią wielokrotnie powtórzone krótkie sekwencje tworzące całe zgrupowania i określane jako *satelitarny* DNA. Ich funkcja nie jest znana; są one skupione głównie w centromerach oraz na końcach chromosomów. Aranżacja satelitarnego DNA (na przykład ilość rozmaitych typów powtórzeń i ich liczba w każdym bloku) jest u poszczególnych osobników tego samego gatunku bardzo różna.

Pozostała część powtarzających się sekwencji DNA składa się z bardziej skomplikowanych powtórzeń, rozproszonych po całym genomie. U ludzi większość tego typu DNA pochodzi od elementów ulegających transpozycji, podobnych do transpozonów występujących w bakteriach, które uległy szczególnie dużemu zwielokrotnieniu. Chociaż genomy wszystkich wielokomórkowych organizmów eukariotycznych zawierają elementy ulegające transpozycji, DNA człowieka i innych naczelnych jest pod tym względem o tyle niezwykły, że zawiera bardzo dużą ilość kopii dwóch sekwencji transpozonowych, które — mogłoby się wydawać — prawie zdominowały nasze chromosomy. Zagadnienie to omówimy obecnie.

Dwie rodziny sekwencji transpozonowych zajmują około 10% genomu człowieka

Ruchome elementy DNA prawdopodobnie występują we wszystkich genomach eukariotycznych i można wśród nich wyróżnić wiele rodzajów sekwencji transpozonowych. Niektóre z nich przemieszczają się z miejsca

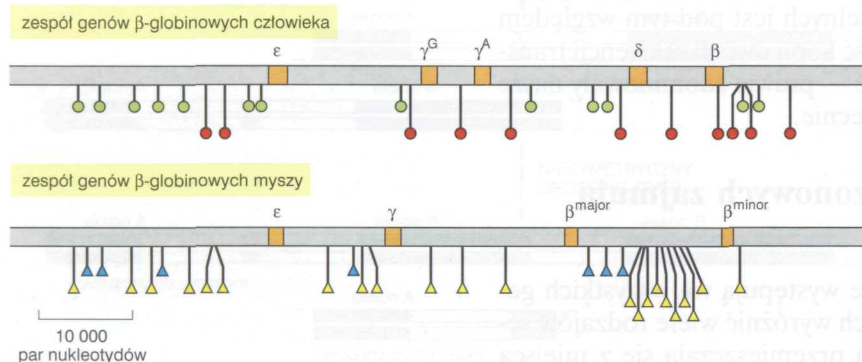


Rys. 9-23. Przemieszczanie się eukariotycznych retrotranspozonów. Transpozony te przemieszczają się, ulegając najpierw przepisaniu na RNA, na podstawie którego następnie tworzona jest kopia dwuniciowego DNA. Kopia DNA ulega insercji w docelowym miejscu cząsteczki DNA. Miejsce docelowe może znajdować się na tej samej cząsteczce DNA, która zawiera sekwencję donorową, lub na innej. Ze względu na podobieństwo tego mechanizmu do replikacji wirusów znanych jako retrowirusy (patrz rys. 9-30), transpozony tego typu są nazywane retrotranspozonami

na miejsce w obrębie tego samego chromosomu za pośrednictwem mechanizmu „wytnij i wklej" omówionego poprzednio w odniesieniu do transpozonów bakteryjnych (patrz rys. 9-18A) i tymi sekwencjami dalej nie będziemy się zajmować. Jednak wiele eukariotycznych transpozonów przemieszcza się nie w postaci DNA, ale poprzez intermediaty RNA. Takie transpozony są nazywane **retrotranspozonami** i jak dotychczas wiadomo, są one unikatowe dla organizmów eukariotycznych.

Przykładem ludzkiego retrotranspozonu jest element L1 (określany też jako *LINE-1*), wielokrotnie powtórzony i stanowiący około 4% całkowitej masy genomu człowieka. Transpozycja sekwencji LINE-1 wymaga najpierw jej transkrypcji na RNA przez komórkowe polimerazy RNA. Następnie enzym *odwrotna transkryptaza* przepisuje sekwencje tego RNA na DNA. Odwrotne transkryptazy są o tyle niezwykłymi polimerazami DNA, że do jego syntezy wykorzystują matryce RNA. Odwrotna transkryptaza u człowieka jest kodowana przez element LINE-1. Utworzona kopia DNA ulega następnie integracji z genomem w innym jego miejscu (rys. 9-23). W jeszcze większej obfitości w genomie człowieka występują bardzo krótkie (do 300 par zasad) sekwencje *Alu*. Haploidalny genom człowieka zawiera około 500 000 kopii tych sekwencji, co stanowi około 5% całkowitego DNA; przeciętnie więc jedna kopia elementu Alu przypada na każde 5000 par nukleotydów. Transkrypcji ulegają jednak tylko niektóre spośród nich. Powstały RNA w rzadko zdarzających się warunkach może znowu ulec przepisaniu na DNA z udziałem odwrotnej transkryptazy kodowanej przez jakieś inne miejsce w genomie.

Porównanie sekwencji i rozmieszczenia odcinków DNA podobnych do elementów L1 i Alu w genomach różnych ssaków sugeruje, że u naczelnych uległy one amplifikacji (powieleniu) do dużej ilości kopii w stosunkowo niedawnym okresie ewolucji (rys. 9-24). Trudno sobie wyobrazić, by



Rys. 9-24. Porównanie zespołów genów β-globiny w genomie człowieka i myszy ukazujące rozmieszczenie transpozonów. Przedstawiony tu odcinek genomu człowieka zawiera pięć funkcjonalnych genów podobnych do genu β-globiny (patrz rys. 9-19), natomiast porównywany odcinek genomu myszy zawiera tylko cztery takie geny. Położenie ludzkich sekwencji Alu zaznaczono *zielonymi kółkami*, a elementów L1 — *czerwonymi*. Genom myszy zawiera inne transpozony: położenie elementów B1 (pokrewnych sekwencji Alu człowieka) zaznaczono *niebieskimi trójkątami*, a pozycje mysich elementów L1 (podobnych do elementów L1 w genomie człowieka) — *żółtymi*. Ponieważ sekwencje transpozonów człowieka i myszy są różne i ponieważ transpozony te są całkiem inaczej rozmieszczone w zespołach genów β-globiny człowieka i myszy, przyjmuje się, że uległy kumulacji w genomach ssaków stosunkowo niedawno (jak na skalę czasu trwania ewolucji). (Dzięki uprzejmości: Ross Hardison, Webb Miller)

te sekwencje, występujące w dużej obfitości i rozproszone po całym genomie, nie wywierały wpływu na ekspresję sąsiednich genów. Ile spośród naszych unikatowych cech człowieczych zawdzięczamy na przykład tym „pasożytniczym" elementom genetycznym?

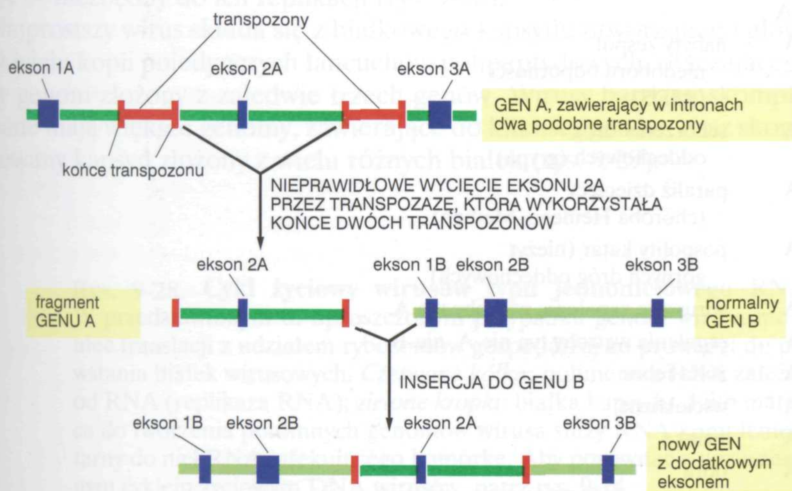
Pytanie 9-4. Wiele transpozonów przemieszcza się w obrębie genomu za pomocą mechanizmów replikacyjnych, takich jak pokazano na rys. 9-18A oraz 9-23, w rezultacie podczas każdej transpozycji wzrasta liczba ich kopii w genomie. Chociaż indywidualne przypadki transpozycji są rzadkie, jednak wiele transpozonów występuje w genomie w postaci wielokrotnych kopii. Co twoim zdaniem przeciwdziała całkowitemu opanowaniu genomu gospodarza przez transpozony?

Elementy ulegające transpozycji przyspieszyły ewolucję genomów

Elementy ulegające transpozycji, szczególnie te, które w genomie występują w wielu kopiach, stwarzają możliwości rearanżacji genomu, służąc jako miejsca rekombinacji homologicznych. Na przykład duplikacje, które doprowadziły do powstania rodziny genów β-globiny, przypuszczalnie nastąpiły w trybie homologicznych rekombinacji sekwencji podobnych do Alu (rys. 9-20, kolor *czerwony*). W ewolucji genomów transpozony odgrywają jednak bardziej bezpośrednią rolę. Oprócz zdolności do przemieszczania swych własnych sekwencji, transpozony sporadycznie przesuwają lub dokonują rearanżacji sekwencji DNA, z którymi sąsiadują w genomie będącym ich gospodarzem. Na przykład jeśli dwa transpozony rozpoznawane przez tę samą transpozazę ulegną integracji z sąsiednimi miejscami w chromosomie, to transpozycji może następnie ulec DNA zawarty między nimi (patrz rys. 9-17 jako *przykład w bakteriach*). Stwarza to w genomach eukariotycznych skuteczny sposób przemieszczania się eksonów (kolejny przykład tasowania eksonów), co prowadzi do nowego ułożenia już istniejących eksonów (rys. 9-25).

Insercja (wstawienie) transpozonu do sekwencji kodującej jakiegoś genu lub do jego rejonu regulatorowego jest stosunkowo częstym przypadkiem spontanicznych mutacji w niektórych organizmach. Transpozony wprowadzone do sekwencji kodujących mogą te sekwencje rozerwać, powodując mutację insercyjną, która znosi zdolność genu do kodowania użytecznego białka. Na przykład pewne mutacje w genie czynnika VIII, powodujące hemofilię, powstały w rezultacie insercji transpozonów do tego genu.

Co najważniejsze dla dróg ewolucji, insercja transpozonu do regulatorowego rejonu genu, niszcząc lub dodając krótkie sekwencje regulatorowe, takie jak opisane w rozdz. 8 (patrz rys. 8-27), często może wywierać bardzo istotny wpływ na ekspresję genów (rys. 9-26). Transpozony mogą więc być ważnym źródłem mutacji, a ich obecność decyduje o mniejszej stabilności sekwencji DNA, niż pierwotnie przypuszczano. Z pewnością



Rys. 9-25. Przykład tasowania eksonów powodowanego przez transpozony. Jeśli zdarzy się, że dwa transpozony jednakowego rodzaju (zaznaczone kolorem *czerwonym*) ulegną insercji do chromosomu niedaleko od siebie, to mechanizm transpozycji może czasami wykorzystać końce dwóch różnych transpozonów (zamiast dwóch końców tego samego transpozonu) i przemieścić zawarty między nimi rejon DNA w nowe miejsce na chromosomie. Wynikiem tego rodzaju transpozycji często jest insercja nowego eksonu do wcześniej istniejącego intronu (co właśnie ilustruje ten rysunek), gdyż introny są znacznie większe od transpozonów


(A)


(B)

Rys. 9-26. Zmiana planu budowy ciała muszki owocowej spowodowana przez mutację. Muszka owocowa (*Drosophila melanogaster*) po lewej jest normalna. U muszki po prawej czułki zostały zmienione w odnóża. Zmiana ta nie jest korzystna dla muszki, ale dobrze ilustruje, w jaki sposób rearanżacja DNA spowodowana przez transpozon może prowadzić do dramatycznych zmian organizmu. (Dzięki uprzejmości: A — E.B. Lewis, B — Matthew Scott)

stanowią powód przejawiania się dużej zmienności genetycznej i prawdopodobnie są odpowiedzialne za wiele ważnych zmian, jakie zaszły w genomach w skali całej ewolucji.

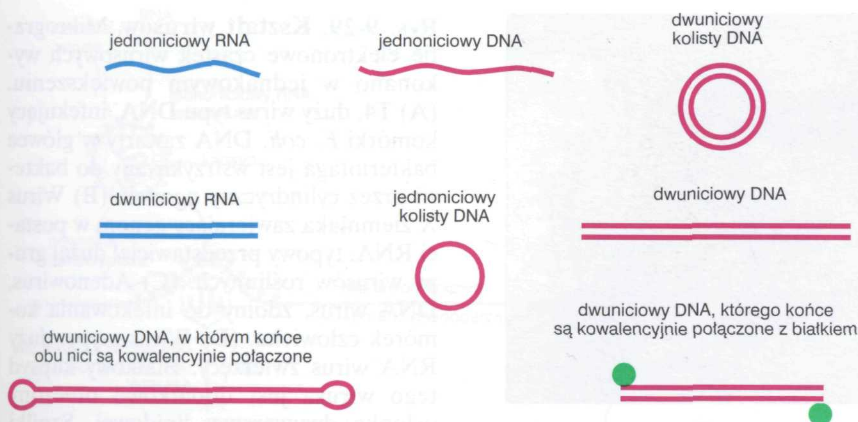
Ruchome elementy genetyczne, takie jak transpozony i plazmidy (występujące także w niektórych komórkach eukariotycznych) prawdopodobnie są ewolucyjnymi przodkami wirusów, które można traktować jako w pełni ruchome elementy genetyczne, zdolne do przemieszcza się z komórki do komórki. Te właśnie zagadnienia będziemy teraz omawiać.

Wirusy są w pełni ruchomymi elementami genetycznymi, zdolnymi do opuszczenia komórki

Wirusy postrzegano pierwotnie jako czynniki chorobotwórcze, które dzięki swym małym rozmiarom przechodziły przez gęste (o niewielkich porach) sączki zdolne do zatrzymywania nawet najmniejszych komórek.

Tabela 9-1. Wirusy wywołujące choroby u ludzi

Wirus	Typ genomu	Schorzenia
Wirusy opryszczki (Herpex simplex virus)	dwuniciowy DNA	powtarzające się wykwity przeziębieniowe
Wirus Epsteina–Barr (EVB)	dwuniciowy DNA	zakaźna mononukleoza
Wirus ospy wietrznej–półpaśca	dwuniciowy DNA	ospa i półpasiec
Wirus ospy	dwuniciowy DNA	ospa
Wirus zapalenia wątroby typ B	częściowo jednoniciowy, częściowo dwuniciowy DNA	wirusowe zapalenie wątroby typ B
Ludzki wirus niedoboru odporności (HIV)	jednoniciowy RNA	nabyty zespół niedoboru odporności (AIDS)
Wirus grypy typ A	jednoniciowy RNA	schorzenia dróg oddechowych (grypa)
Wirus polio	jednoniciowy RNA	paraliż dziecięcy (choroba Heinego–Medina)
Rynowirusy	jednoniciowy RNA	pospolity katar (nieżyt górnych dróg oddechowych)
Wirus zapalenia wątroby typ A	jednoniciowy RNA	wirusowe zapalenie wątroby typ A
Wirus zapalenia wątroby typ C	jednoniciowy RNA	zapalenie wątroby typ nie-A, nie-B
Wirus żółtej febry	jednoniciowy RNA	żółta febra
Wirus wścieklizny	jednoniciowy RNA	wścieklizna
Wirus świnki	jednoniciowy RNA	świnka
Wirus odry	jednoniciowy RNA	odra

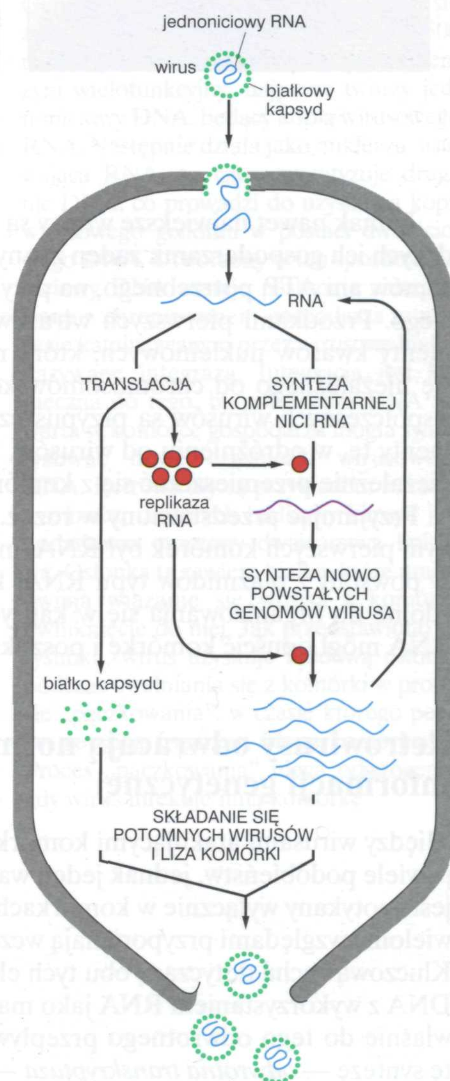


Rys. 9-27. Schematyczne rysunki niektórych rodzajów genomów wirusowych. Najmniejsze wirusy zawierają tylko kilka genów, a ich genom jest zbudowany z RNA lub DNA. Największe wirusy zawierają setki genów w genomie zbudowanym z dwuniciowego DNA. Przykłady wirusów różnego typu — *forma genomu*: wirus mozaiki tytoniu, bakteriofag R17, wirus polio — *jednoniciowy RNA*; reowirus — *dwuniciowy RNA*; parwowirusy — *jednoniciowy DNA*; bakteriofagi M13 lub φX174 — *jednoniciowy kolisty DNA*; SV40 i wirusy polioma — *dwuniciowy kolisty DNA*; bakteriofag T4, wirus opryszczki — *dwuniciowy DNA*; adenowirusy — *dwuniciowy DNA o końcach kowalencyjnie połączonych z białkiem*; poksowirusy — *dwuniciowy DNA*, z *kowalencyjnie połączonymi końcami obu nici.* Szczególne końce (oraz formy koliste) występujące w genomach niektórych wirusów służą do pokonania trudności związanych z replikacją kilku ostatnich nukleotydów w łańcuchu DNA (patrz rys. 8-6)

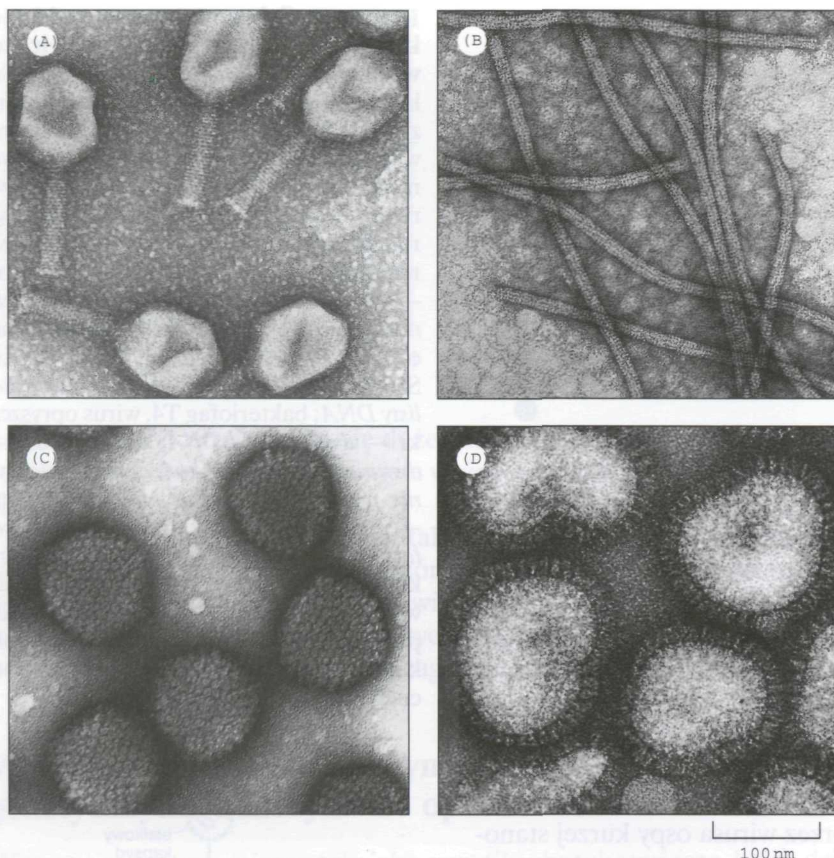
Obecnie wiemy, że wirusy w istocie są genami zamkniętymi w ochronnym kapsydzie białkowym. Jak przedstawiono w pierwszej części tego rozdziału (patrz rys. 9-14), geny te muszą wniknąć do komórki i wykorzystać aparat komórkowy do swojej ekspresji na poziomie białek oraz do replikacji, by liczne swoje kopie umieścić w nowych kapsydach. Reprodukcja jakiegoś wirusa w komórce często jest dla niej letalna; w wielu przypadkach zainfekowana komórka ulega rozpadowi (lizie), uwalniając w ten sposób potomne wirusy i umożliwiając im dostęp do sąsiednich komórek. Wiele klinicznych objawów zakażeń wirusowych to efekty lityczne wywoływane przez wirusy. Wykwity przeziębieniowe powodowane przez wirusa opryszczki (*herpes simplex*) lub pęcherzyki wywołane przez wirusa ospy kurzej stanowią przejawy lokalnego zabicia komórek skóry. Jako pierwsze wykryto wirusy atakujące komórki ssaków, obecnie jednak wiadomo, że istnieje bardzo dużo rozmaitych rodzajów wirusów. Niektóre z nich infekują rośliny, inne — komórki bakterii.

Genom wirusowy może być zbudowany z DNA lub RNA i może być jedno- lub dwuniciowy (tab. 9-1 i rys. 9-27). Ilość DNA lub RNA, jaką może pomieścić białkowy kapsyd wirusów, jest ograniczona i za mała, by kodować liczne rozmaite enzymy i inne białka potrzebne do replikacji nawet najprostszego wirusa. Wirusy są dlatego pasożytami, zdolnymi do reprodukcji jedynie wewnątrz żywych komórek, gdzie w rabunkowy sposób korzystają z komórkowego aparatu biochemicznego. Typowe genomy wirusowe kodują białka kapsydu oraz białka umożliwiające wykorzystanie enzymów gospodarza do swej własnej replikacji. Wirusy, których genom jest zbudowany z RNA, dodatkowo muszą kodować enzym — replikazę RNA — niezbędny do ich replikacji (rys. 9-28).

Najprostszy wirus składa się z białkowego kapsydu utworzonego głównie z wielu kopii pojedynczych łańcuchów polipeptydowych, otaczającego mały genom złożony z zaledwie trzech genów. Wirusy bardziej skomplikowane mają większe genomy, zawierające do kilkuset genów, oraz skomplikowany kapsyd złożony z wielu różnych białek (rys. 9-29).



Rys. 9-28. Cykl życiowy wirusów typu jednoniciowego RNA. W przedstawionym tu uproszczonym przypadku genom wirusa może ulec translacji z udziałem rybosomów gospodarza, co prowadzi do powstania białek wirusowych. *Czerwone kółka*: polimeraza RNA zależna od RNA (replikaza RNA); *zielone kropki*: białka kapsydu. Jako matryca do tworzenia potomnych genomów wirusa służy RNA komplementarny do nici RNA infekującego komórkę. Aby porównać z uproszczonym cyklem życiowym DNA wirusów, patrz rys. 9-14



Rys. 9-29. Kształt wirusów. Mikrografie elektronowe cząstek wirusowych wykonano w jednakowym powiększeniu. (A) T4, duży wirus typu DNA, infekujący komórki *E. coli*. DNA zawarty w główce bakteriofaga jest wstrzykiwany do bakterii przez cylindryczny ogonek. (B) Wirus X ziemniaka zawierający genom w postaci RNA, typowy przedstawiciel dużej grupy wirusów roślinnych. (C) Adenowirus, DNA wirus, zdolny do infekowania komórek człowieka. (D) Wirus grypy, duży RNA wirus zwierzęcy. Białkowy kapsyd tego wirusa jest dodatkowo otoczony osłonką dwuwarstwy lipidowej. Szpilki wystające z osłonki są wirusowym białkami zanurzonymi w dwuwarstwie lipidowej (pochodzącej z błony komórkowej gospodarza) (patrz rys. 9-30). (Dzięki uprzejmości: A — James Paulson; B — Graham Hills; C — Mei Lie Wong; D — R.C. Williams, H.W. Fisher)

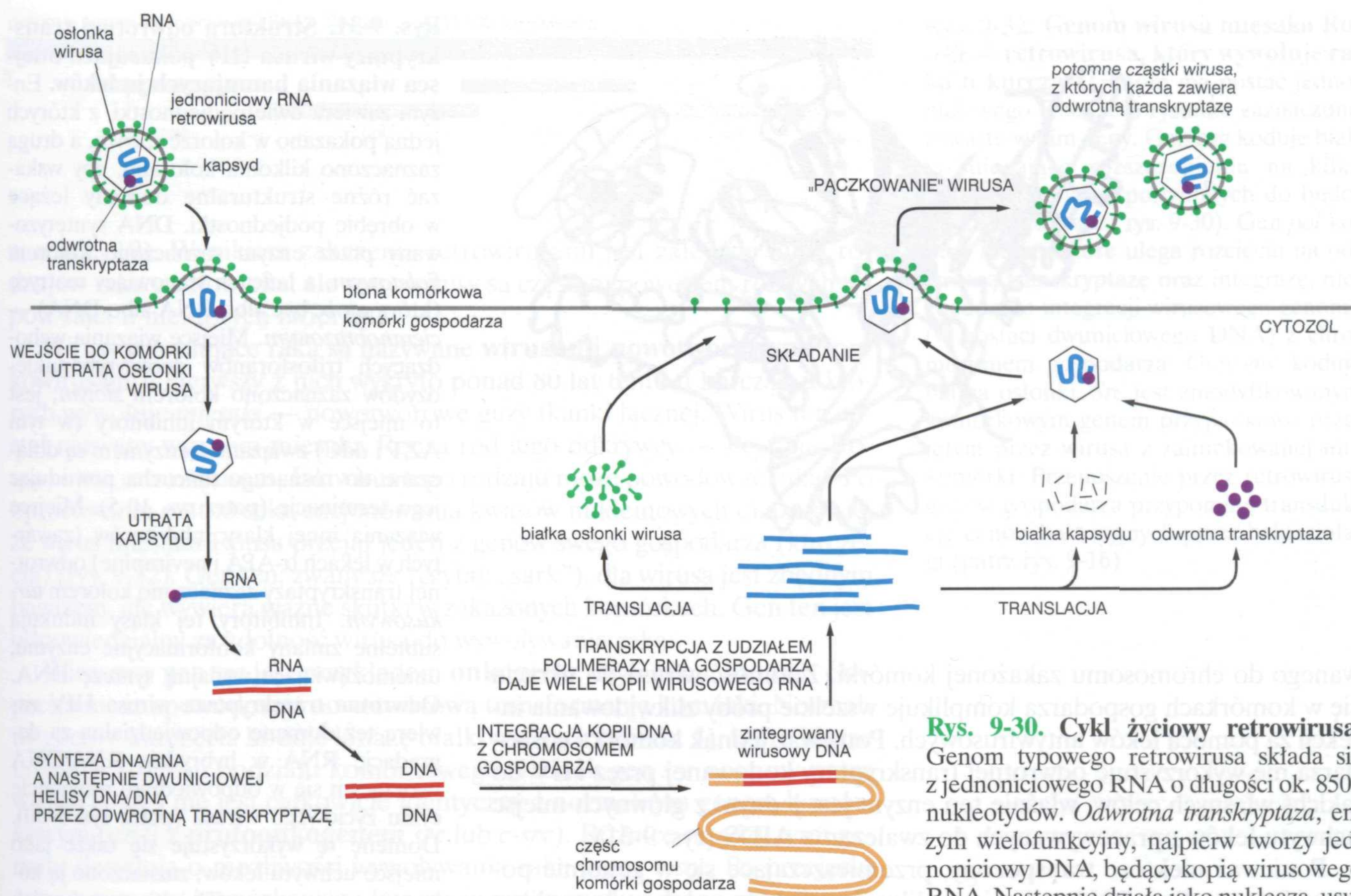
Jednak nawet największe wirusy są całkowicie zależne od komórek będących ich gospodarzami: żaden znany wirus nie wytwarza własnych rybosomów ani ATP, potrzebnego, na przykład, do replikacji kwasu nukleinowego. Przodkami pierwszych wirusów prawdopodobnie były małe fragmenty kwasów nukleinowych, które rozwinęły zdolność do namnażania się niezależnego od chromosomów komórki. Najbliższymi krewniakami współczesnych wirusów są przypuszczalnie plazmidy i transpozony. Elementy te, w odróżnieniu od wirusów, nie wytwarzają kapsydu i nie mogą niezależnie przemieszczać się z komórki do komórki.

Przyjmując przedstawiony w rozdz. 7 pogląd, że materiałem genetycznym pierwszych komórek był RNA, możemy też uznać, że pierwsze wirusy powstały z plazmidów typu RNA, które uzyskały gen kodujący białko zdolne do organizowania się w kapsyd. Po uzyskaniu kapsydu wirusowy RNA mógł opuścić komórkę i poszukiwać nowego gospodarza.

Pytanie 9-5. Jednoniciowe genomy RNA niektórych wirusów służą jako mRNA i po wniknięciu do komórki ulegają translacji do białek, wykorzystując rybosomy gospodarza (patrz rys. 9-28). Jednak genomy innych wirusów typu RNA są komplementarne do informacyjnych RNA, stanowiących matryce do syntezy wirusowych białek. Takie wirusy są określane jako wirusy zawierające nici „minus" RNA. Jakie modyfikacje należałoby wprowadzić do rys. 9-28, by wytłumaczyć cykl życiowy tej klasy wirusów?

Retrowirusy odwracają normalny przepływ informacji genetycznej

Między wirusami atakującymi komórki bakteryjne i eukariotyczne istnieje wiele podobieństw, jednak jeden ważny typ wirusów — **retrowirusy** — jest spotykany wyłącznie w komórkach eukariotycznych. Retrowirusy pod wieloma względami przypominają wcześniej omówione retrotranspozony. Kluczową cechą dotyczącą obu tych elementów genetycznych jest synteza DNA z wykorzystaniem RNA jako matrycy (określenie „retro" odnosi się właśnie do tego odwrotnego przepływu informacji). Enzym katalizujący tę syntezę — *odwrotna transkryptaza* — jest kodowany przez genom retro-



Rys. 9-30. Cykl życiowy retrowirusa. Genom typowego retrowirusa składa się z jednoniciowego RNA o długości ok. 8500 nukleotydów. *Odwrotna transkryptaza*, enzym wielofunkcyjny, najpierw tworzy jednoniciowy DNA, będący kopią wirusowego RNA. Następnie działa jako nukleaza, usuwająca RNA, po czym syntetyzuje drugą nić DNA, co prowadzi do uzyskania kopii wirusowego genomu w postaci dwuniciowego DNA. Utworzony w ten sposób dwuniciowy DNA zostaje następnie zintegrowany z chromosomem gospodarza w procesie katalizowanym przez wirusowe białko nazywane integrazą. Integracja jest konieczna do tego, by polimeraza RNA zawarta w komórce gospodarza mogła syntetyzować nowe cząsteczki wirusowego RNA. Retrowirusy są przykładem *wirusów z osłonką*, u których białkowy kapsyd jest dodatkowo otoczony dwuwarstwą lipidową. Osłonka ta zawiera białka, które umożliwiają wiązanie się wirusa z komórką i wniknięcie do niej. Jak przedstawiono na rysunku, wirus uzyskuje lipidową osłonkę podczas uwalniania się z komórki w procesie „pączkowania", w czasie którego porywa ze sobą fragment błony komórkowej. Proces „pączkowania" ulega odwróceniu, gdy wirus infekuje inną komórkę

wirusów (jednoniciowy RNA) i kilka jego cząsteczek znajduje się razem z genomowym RNA w kapsydzie każdego retrowirusa.

Cykl życiowy retrowirusów przedstawiono na rys. 9-30. Odwrotna transkryptaza wnika do zainfekowanej komórki razem z genomowym RNA retrowirusa i syntetyzuje łańcuch DNA, tworzący hybryd DNA/RNA o strukturze dwuniciowej helisy. Nić RNA zostaje następnie usunięta, a odwrotna transkryptaza (która jako matrycę może wykorzystywać albo DNA albo RNA) syntetyzuje z kolei drugą nić DNA, komplementarną do utworzonej poprzednio, w rezultacie tworzy się więc dwuniciowa helisa DNA. Taki DNA ulega następnie integracji — w przypadkowo wybranym miejscu — z genomem gospodarza, w czym uczestniczy enzym *integraza*, również kodowany przez wirusa. W tym stanie, przypominającym sytuację bakteriofaga zintegrowanego z genomem bakteryjnym (patrz rys. 9-15), wirus jest latentny (uśpiony); jednak podczas każdego podziału komórka gospodarza przekazuje kopię wirusowego genomu komórkom potomnym.

Następny etap replikacji retrowirusa, który może zajść w długi czas po jego integracji z genomem gospodarza, polega na transkrypcji zintegrowanego wirusowego DNA przez polimerazę RNA komórki gospodarza i prowadzi do powstania dużej ilości jednoniciowych RNA identycznych z RNA, który dokonał infekcji. Wykorzystując aparat translacyjny komórki gospodarza, cząsteczki wirusowych RNA ulegają następnie translacji i tworzą się białka kapsydu, białka osłonki i odwrotna transkryptaza, które razem z genomowym RNA są składane w nowe cząstki wirusowe.

Retrowirusem jest ludzki wirus niedoboru odporności (HIV), powodujący AIDS. Podobnie jak w przypadku innych retrowirusów, genom HIV może istnieć w stanie latentnym w formie prowirusowego DNA wbudo-



Rys. 9-31. **Struktura odwrotnej transkryptazy wirusa HIV pokazująca miejsca wiązania hamujących ją leków.** Enzym zawiera dwie podjednostki, z których jedną pokazano w kolorze *szarym*, a drugą zaznaczono kilkoma kolorami, aby wskazać różne strukturalne domeny leżące w obrębie podjednostki. DNA syntetyzowany przez enzym zaznaczono kolorem *fioletowym*, a łańcuch stanowiący matrycę (którą może być albo RNA albo DNA) — *ciemnobrązowym*. Miejsce wiązania wchodzących trifosforanów deoksyrybonukleozydów zaznaczono kolorem *złotym*; jest to miejsce w którym inhibitory (w tym AZT i ddC) związane z enzymem są dołączane do rosnącego łańcucha powodując jego terminację (patrz rys. 10-5). Miejsce wiązania innej klasy inhibitorów (zawartych w lekach α-APA i nevirapine) odwrotnej transkryptazy zaznaczono kolorem *turkusowym*. Inhibitory tej klasy indukują subtelne zmiany konformacyjne enzymu, uniemożliwiające wydajną syntezę DNA. Odwrotna transkryptaza wirusa HIV zawiera też domenę odpowiedzialną za degradację RNA w hybrydzie RNA/DNA tworzącym się w odpowiednim momencie cyklu życiowego wirusa (patrz rys. 9-30). Domenę tę wykorzystuje się także jako miejsce uchwytu leków; zaznaczono ją kolorem czerwonym. (Dzięki uprzejmości: Edward Arnold)

wanego do chromosomu zakażonej komórki. Zdolność wirusa do ukrycia się w komórkach gospodarza komplikuje wszelkie próby zlikwidowania infekcji za pomocą leków antywirusowych. Ponieważ jednak komórka gospodarza nie wykorzystuje odwrotnej transkryptazy kodowanej przez HIV do jakichś własnych celów, właśnie ten enzym jest jednym z głównych miejsc uchwytu leków opracowywanych do zwalczania AIDS (rys. 9-31).

Ponieważ niektóre transpozony, przemieszczające się w genomie poprzez intermediaty RNA, ulegają replikacji w sposób podobny do replikacji genomów retrowirusowych (patrz rys. 9-23), przypuszcza się, że retrowirusy pochodzą od takich retrotranspozonów, które dawno temu uzyskały dodatkowe geny kodujące białka kapsydu i inne białka niezbędne do utworzenia cząstek wirusowych. RNA, stanowiący pośredni produkt ich replikacji, mógł być następnie upakowany w cząstkę wirusową i opuścić komórkę.

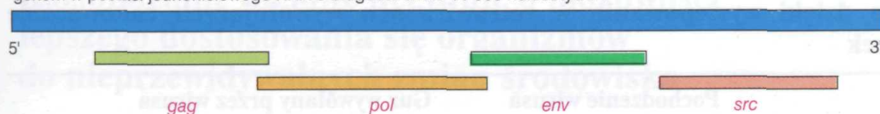
Wirusy ulegające integracji z DNA komórki gospodarza są — podobnie jak transpozony — potencjalnymi czynnikami zmian genetycznych, czego różne powody omówiono wcześniej (patrz s. 296–297). Retrowirusy, podobnie jak bakteriofag lambda, mogą przejmować z genomu gospodarza pewne odcinki i przenosić je (w formie RNA) do nowego gospodarza (patrz rys. 9-16). Ponieważ wiele retrowirusów wykazuje zdolność do zakażania więcej niż jednego gatunku, w zasadzie mogą one dokonywać przenoszenia genów z jednego gatunku do drugiego. Genomy współczesnych organizmów dostarczają dowodów, że taki sposób przenoszenia genów odgrywał w toku ewolucji istotną rolę.

W następnym podrozdziale zobaczymy, że zdolność retrowirusów do przejmowania genów od ich gospodarzy dostarczyła ważnych wskazówek w badaniach przyczyn raka.

Pytanie 9-6. Odwrotne transkryptazy, syntetyzując DNA na matrycy RNA, nie sprawdzają poprawności produktu. Jakie ten fakt może mieć, twoim zdaniem, konsekwencje w leczeniu AIDS?

Retrowirusy zawierające geny przejęte od gospodarza mogą być rakotwórcze

Retrowirusy są interesujące nie tylko ze względu na niezwykły sposób namnażania się, ale także dlatego, że odegrały decydującą rolę w udowodnieniu, iż większość rodzajów raka jest powodowana przez mutacje w niewielkim zespole genów komórkowych (omówiono to zagadnienie



Rys. 9-32. Genom wirusa mięsaka Rousa — retrowirusa, który wywołuje raka u kurcząt. Genom ma postać jednoniciowego RNA. Na rysunku zaznaczono zawarte w nim geny. Gen *gag* koduje białko ulegające rozszczepieniu na kilka mniejszych białek potrzebnych do budowy kapsydu (patrz rys. 9-30). Gen *pol* koduje białko, które ulega rozcięciu na odwrotną transkryptazę oraz integrazę, niezbędną do integracji wirusowego genomu (w postaci dwuniciowego DNA) z chromosomem gospodarza. Gen *env* koduje białka osłonki. *Src* jest zmodyfikowanym komórkowym genem przypadkowo przejętym przez wirusa z zainfekowanej nim komórki. Przenoszenie przez retrowirusy genów gospodarza przypomina transdukcję genów bakteryjnych przez bakteriofagi (patrz rys. 9-16)

w rozdz. 19). Wynikiem zakażenia retrowirusami jest zaledwie kilka rodzajów raka u człowieka, ale retrowirusy są częstym powodem różnych typów raka u niektórych zwierząt.

Wirusy wywołujące raka są nazywane **wirusami nowotworowymi** (onkowirusami). Pierwszy z nich wykryto ponad 80 lat temu u kurcząt, u których wywołuje *mięsaki* — nowotworowe guzy tkanki łącznej. Wirus ten został nazwany wirusem mięsaka Rousa (od jego odkrywcy — Peytona Rousa) i jest retrowirusem. Jak wirus tego rodzaju może powodować raka? Po opracowaniu metod sekwencjonowania kwasów nukleinowych okazało się, że wirus mięsaka Rousa przejął jeden z genów swego gospodarza (kurczęcia) (rys. 9-32). Gen ten, zwany *src* (czytaj: „sark”), dla wirusa jest zbędnym bagażem, ale wywiera ważne skutki w zakażonych komórkach. Gen ten jest odpowiedzialny za zdolność wirusa do wywoływania raka.

Wirusowy gen *src* jest przykładem **onkogenu**, czyli genu, którego ekspresja może spowodować nowotworową transformację komórki. Normalny gen *src* kurczęcia koduje kinazę białkową (patrz rozdz. 5), która bierze udział w kontroli podziału komórkowego. Jednak gen *src* noszony przez wirusa (*v-src*) nie jest całkowicie identyczny z normalnym genem komórkowym (czyli z **protoonkogenem** *src* lub *c-src*). Różnice między tymi genami decydują o możliwości wywoływania raka przez *v-src*. Po przejęciu genu z genomu komórkowego kurczęcia przez ewolucyjnego przodka wirusa mięsaka Rousa, niewielka część genu uległa zmianie, wskutek czego kinaza białkowa kodowana przez gen *v-src* różni się kilkoma aminokwasami od normalnego enzymu występującego w komórkach kurczęcia. Ta niewielka różnica wystarczy jednak, by enzym wyłamał się spod kontroli komórkowej i przekształcił się w enzym znacznie bardziej aktywny. W rezultacie zakażone komórki, w których zachodzi ekspresja wirusowego genu *src*, ulegają niekontrolowanym podziałom i ostatecznie tworzą guz nowotworowy.

Inne retrowirusy powodujące nowotwory przejęły różne inne geny komórkowe (tab. 9-2). Każdy z wirusowych onkogenów prowadził do wykrycia odpowiadającego mu normalnego protoonkogenu, co umożliwiło zidentyfikowanie wielu genów uczestniczących w kontroli podziałów komórkowych. Po odkryciu najważniejszych protoonkogenów w komórkach człowieka stwierdzono, że mutacje tych genów przyczyniają się do rozwoju wielu typów raka. Jak na to wskazano w rozdz. 19, różne formy raka człowieka tworzą się dopiero po nagromadzeniu się w komórce kilku mutacji (patrz też rys. 6-24). Wiemy obecnie, że wiele spośród tych mutacji prowadzi do uszkodzenia protoonkogenów i przekształcenia ich w onkogeny.

Większość protoonkogenów koduje białka uczestniczące w regulacji „społecznego” zachowania się komórek w organizmie (patrz rozdz. 19). Na przykład zróżnicowane komórki często otrzymują od innych komórek sygnał nakazujący im zaprzestanie podziałów. Jednak mutacje w obrębie niektórych protoonkogenów powodują, że komórka otrzymująca sygnały staje się na nie niewrażliwa, a więc mutacje przyczyniają się do niekontrolowanego mnożenia się. Duża część naszej obecnej wiedzy o powstawaniu raka u człowieka opiera się na wynikach badań onkogenów, wykrytych po raz pierwszy w retrowirusach.

Tabela 9-2. Niektóre onkogeny wykryte dzięki występowaniu w retrowirusach wywołujących rakowacenie zainfekowanych nimi komórek

Onkogen	Funkcja protoonkogenu	Pochodzenie wirusa	Guz wywołany przez wirusa
abl	kinaza białkowa (tyrozynowa)	mysz kot	białaczka (*leucaemia*) limfocytów pre-B mięsak (*sarcoma*)
erb-B	receptor EGF, czynnika wzrostu komórek nabłonkowych	kurczę	erytroleukemia (choroba di Gugielma); włókniakomięsak (*fibrosarcoma*)
fes	kinaza białkowa (tyrozynowa)	kot/kurczę	mięsak
fms	receptor M-CSF, czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów	kot	mięsak
fos, jun	asocjuje tworząc białkowy czynnik transkrypcyjny	mysz kurczę	kostniakomięsak (*osteosarcoma*) włókniakomięsak
myc	białko regulujące geny	kurczę	mięsak; szpiczak mnogi
raf	kinaza białkowa (serynowo-treoninowa)	kurczę/mysz	mięsak
H-ras	białko wiążące GTP	szczur	mięsak; erytroleukemia
rel	białko regulatorowe genu	indyk	siatkowico-śródbłonkowica (*reticuloendotheliosis*)
sis	łańcuch B czynnika wzrostu płytek krwi	małpa	mięsak
src	kinaza białkowa (tyrozynowa)	kurczę	mięsak

Protoonkogeny *fos*, *jun*, *myc* i *rel* kodują białka normalnie znajdujące się w jądrze, gdzie uczestniczą w regulacji transkrypcji. Protoonkogeny *erb-B* i *fms* kodują białka eksponowane na zewnętrznej stronie błon komórkowych, gdzie odbierają sygnały pochodzące z otoczenia komórki i przekazują je do wnętrza komórki (patrz rozdz. 15). Onkogeny *abl*, *fes*, *ras*, *raf* i *src* kodują białka cytoplazmatyczne, działające jako składniki kaskad przekazujących sygnały (rozdz. 15). Protoonkogen *sis* koduje białko sekrecyjne, które przekazuje innym komórkom sygnał do dzielenia się.

Dotychczas w obecnym rozdziale wykazano, że zmiany zachodzące w genomie komórek są bogatym źródłem zmienności genetycznej, na którą może działać nacisk doboru naturalnego. Mutacje mogą się gromadzić w rezultacie błędów replikacji, przemieszczania się transpozonów w różne pozycje genomu oraz wnikania do komórek i ich opuszczania przez wirusy, czemu czasem towarzyszy przemieszczanie się małych fragmentów genomu z jednej komórki do drugiej. W końcowej części rozdziału przedstawimy, w jaki sposób rozmnażanie płciowe jest źródłem dodatkowej zmienności genetycznej żywych form na naszej planecie.

Rozmnażanie płciowe i segregacja genów

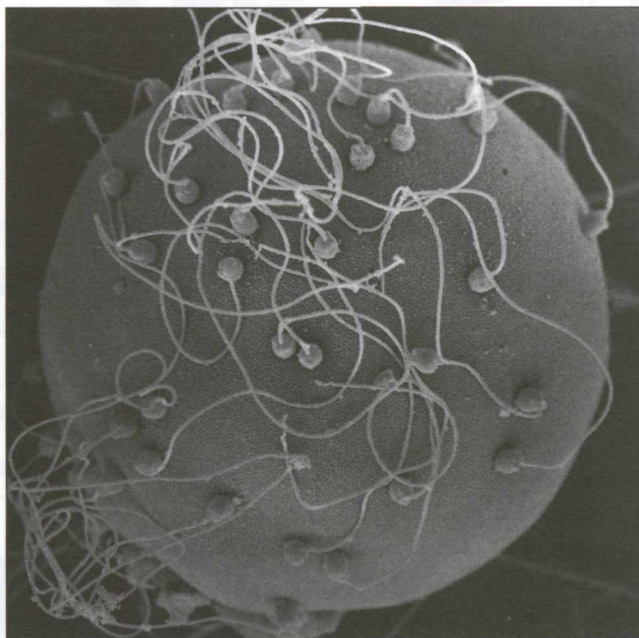
Wiele organizmów może rozmnażać się w sposób bezpłciowy: bakterie i inne organizmy jednokomórkowe rozmnażają się przez podział komórek. Bezpłciowo rozmnaża się też dużo roślin, wydających pędy, które następnie oddzielają się od rośliny macierzystej i tworzą nową samodzielną roślinę. Nawet w królestwie zwierząt niektóre robaki mogą ulec rozerwaniu na dwie części i w każdej z nich dochodzi do regeneracji części brakującej. O ile jednak takie rozmnażanie bezpłciowe jest proste i bezpośrednie, o tyle prowadzi do potomstwa genetycznie identycznego z organizmem macierzystym. Podczas rozmnażania płciowego dochodzi natomiast do wymieszania się genomów dwóch osobników, dającego potomstwo genetycznie odmienne od obojga rodziców. Taki sposób rozmnażania musi mieć oczywiste zalety, skoro przyjęła go olbrzymia większość roślin i zwierząt.

Rozmnażanie płciowe decyduje o możliwości lepszego dostosowania się organizmów do nieprzewidywalnych zmian środowiska

Rozmnażanie płciowe jest bardzo skomplikowane, a organizmy przeznaczają na ten cel znaczą część swych zasobów materiałowych i energetycznych. Jakie zatem są jego zalety i dlaczego ewolucja poszła w tym kierunku? Przez mieszanie genów osobniki rozmnażające się płciowo dają potomstwo różniące się w nieprzewidywalny sposób od rodziców, a złożony genom organizmu potomnego może w równym stopniu ulec polepszeniu, jak i pogorszeniu. Dlaczego więc gatunki rozmnażające się płciowo miałyby wykazywać przewagę we współzawodnictwie z gatunkami, których rozmnażanie jest wyłącznie bezpłciowe? Problem ten nadal intryguje genetyków, chociaż ogólnie przyjęto pogląd, że ponowne tasowanie się genów podczas rozrodu płciowego pomaga gatunkom przetrwać w zmiennych warunkach środowiska. Jeśli dwoje rodziców wydaje liczne potomstwo z dużą różnorodnością kombinacji genów, to istnieje większa szansa, że przynajmniej jeden potomek będzie wykazywać kombinację cech niezbędną do przetrwania w określonych warunkach.

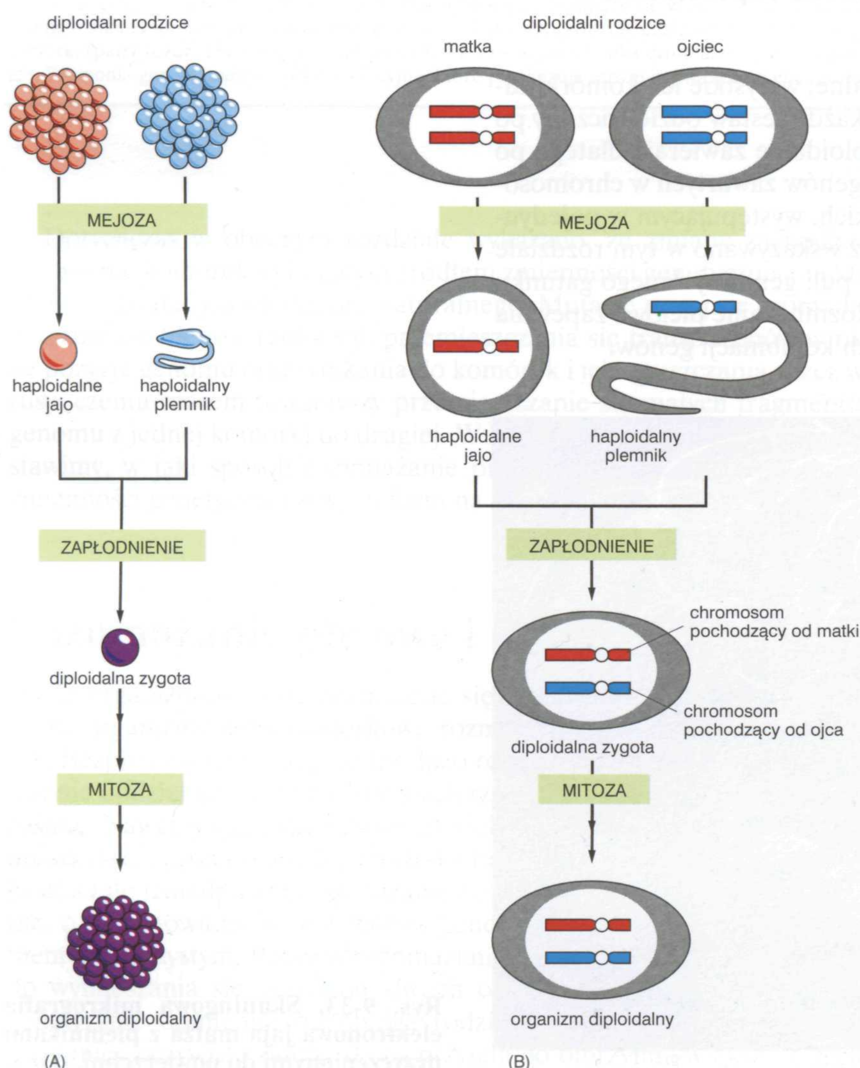
Rozmnażanie płciowe łączy komórki diploidalne i haploidalne

Płciowo rozmnażają się organizmy diploidalne; wszystkie ich komórki zawierają po dwa zestawy chromosomów — każdy zestaw odziedziczony po jednym z rodziców. Wszystkie komórki diploidalne zawierają dlatego po dwie kopie każdego z genów (z wyjątkiem genów zawartych w chromosomie determinującym płeć osobników męskich, występującym w pojedynczej kopii), przy czym kopie te — na co już wskazywano w tym rozdziale — nie muszą być identyczne. Co więcej, w puli genowej danego gatunku istnieją liczne warianty każdego z genów. Rozmnażanie płciowe zapewnia ciągłość ponawiania prób tworzenia nowych kombinacji genów.



Rys. 9-33. Skaningowa mikrografia elektronowa jaja małża z plemnikami przyczepionymi do powierzchni. (Dzięki uprzejmości: David Epel)

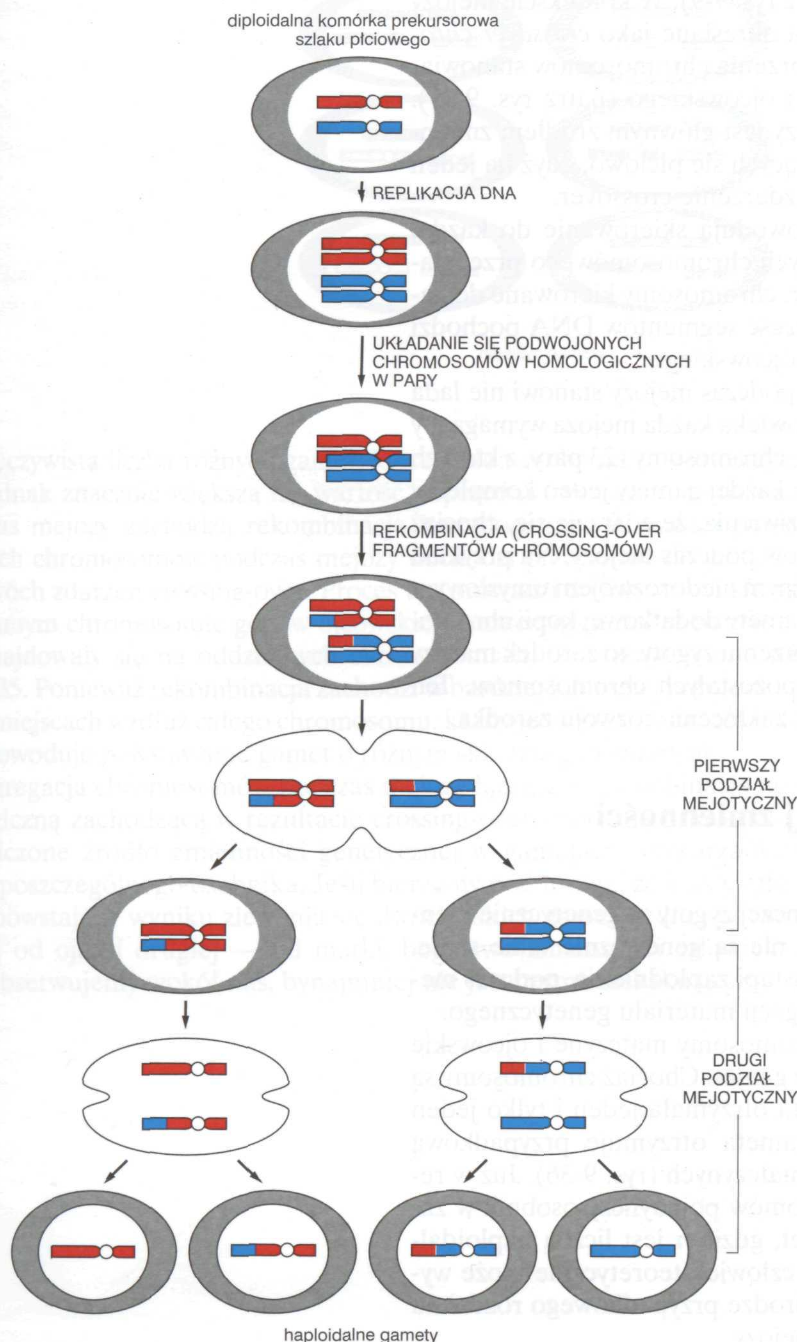
W przeciwieństwie do wszystkich innych komórek organizmu diploidalnego, wyspecjalizowane komórki bezpośrednio uczestniczące w rozmnażaniu płciowym — **komórki rozrodcze**, czyli *gamety* — są haploidami. Każda z nich zawiera tylko jeden zestaw chromosomów. W typowym przypadku tworzą się dwa rodzaje gamet. U zwierząt jeden z nich stanowią duże, niezdolne do samodzielnego ruchu **komórki jajowe**. Drugi rodzaj stanowią małe ruchliwe komórki, określane jako **plemniki** (rys. 9-33). Haploidalne komórki rozrodcze powstają z komórek diploidalnych, ulegających specjalnemu procesowi podziałów komórkowych, zwanemu *mejozą* (rys. 9-34). Podczas mejozy chromosomy podwójnego zestawu chromosomów zostają w nowych kombinacjach rozdzielone na pojedyncze zestawy chromosomów. Haploidalne gamety zlewają się następnie, tworząc komórkę diploidalną (zapłodnione jajo, czyli *zygotę*). Z zygoty rozwija się następnie nowy osobnik, zawierający zestaw chromosomów odmienny od zestawu u każdego z jego rodziców. W ten sposób, przez kolejno następujące cykle diploidalności, mejozy, haploidalności i zlewania się komórek dochodzi do rezygnacji ze starych kombinacji genów i tworzenia się nowych kombinacji.



Rys. 9-34. Cykl haploid–diploid w rozmnażaniu płciowym. (A) Komórki wyższych eukariotów mnożą się w fazie diploidalnej, tworząc wielokomórkowy organizm; haploidami są zazwyczaj jedynie gamety (tj. jaja i plemniki). (B) Rozmnażanie płciowe prowadzi do rozdziału chromosomów w nowych kombinacjach. Na przykład człowiek w pojedynczej gamecie ma 23 chromosomy. Dla uproszczenia w każdej gamecie pokazano tylko jeden chromosom

Podczas mejozy komórki haploidalne powstają z komórek diploidalnych

Jak przedstawiono w rozdz. 17, podczas zwykłego podziału — mitozy komórki precyzyjnie podwajają obydwa zestawy chromosomów i przekazują po jednym zestawie komórkom potomnym. Proces tworzenia się komórek rozrodczych jest inny, ponieważ do każdej komórki rozrodczej z wyjściowej komórki diploidalnej zostaje przekazany tylko jeden zestaw chromosomów. Proces ten, zwany **mejozą** polega na podwojeniu każdego z chromosomów i następnych dwóch kolejnych podziałach komórkowych. Ruch chromosomów podczas mejozy przypomina skomplikowany taniec, co szczegółowo przedstawiono na końcu rozdz. 17. Tutaj proces ten tylko zarysujemy.



Rys. 9-35. Mejoza. Aby uprościć rysunek, pokazano tylko jedną parę chromosomów. Po replikacji DNA w wyjściowej komórce diploidalnej, do wytworzenia haploidalnych gamet są potrzebne dwa podziały komórkowe. Każda komórka diploidalna wchodząca w cykl mejotyczny (u zwierząt zdolność do tego ma tylko specjalna grupa komórek) wytwarza dlatego cztery komórki haploidalne

Miejscem rozpoczęcia się mejozy są wyspecjalizowane komórki jajników lub jąder. Każda z nich zawiera po dwie kopie każdego chromosomu, jedną odziedziczoną od ojca (homolog ojcowski) i jedną odziedziczoną od matki (homolog matczyny). Jak przedstawiono na rys. 9-35, pierwszym etapem mejozy, podobnie jak mitozy, jest podwojenie chromosomów tych diploidalnych komórek: zawarty w nich DNA ulega replikacji i dwie potomne cząsteczki DNA w kompleksie z białkami tworzą nowe chromosomy (patrz rozdz. 8). Podobnie jak w mitozie, nowe chromosomy pozostają „zrośnięte" ze sobą niczym bracia syjamscy.

W następnej fazie procesu każdy podwojony chromosom ojcowski tworzy parę z jednym z podwojonych homologów matczynych. Proces ten jest unikatowy dla mejozy. Ponieważ sekwencje nukleotydowe homologicznych chromosomów matczynego i ojcowskiego są w wielu miejscach identyczne, a obydwa chromosomy znajdują się w bliskim sąsiedztwie, mogą ulegać rekombinacji homologicznej (patrz rys. 9-9). W kontekście mejozy tego rodzaju zjawiska rekombinacyjne są określane jako *crossover chromosomów* lub *chiazmy* i prowadzą do tworzenia chromosomów stanowiących hybrydy chromosomu matczynego i ojcowskiego (patrz rys. 9-35). Rekombinacja zachodząca podczas mejozy jest głównym źródłem zmienności genetycznej u gatunków rozmnażających się płciowo, gdyż na jeden chromosom przypada co najmniej jedno zdarzenie crossover.

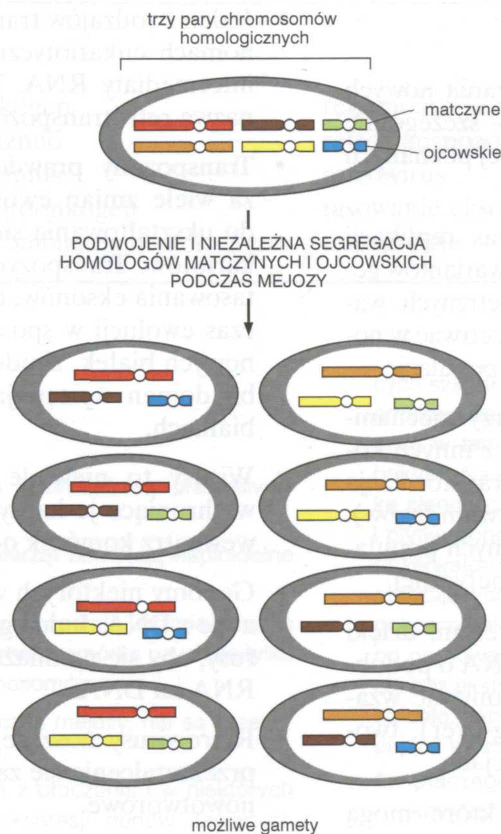
Dwa kolejne podziały komórkowe powodują skierowanie do każdej gamety kompletnego zestawu pojedynczych chromosomów, co przedstawia rys. 9-35. Ze względu na crossing-over, chromosomy kierowane do gamet mogą zawierać hybrydy, w których część segmentów DNA pochodzi od chromosomu matczynego, a część od ojcowskiego.

Segregacja chromosomów zachodząca podczas mejozy stanowi nie lada wyczyn komórkowej rachunkowości: u człowieka każda mejoza wymaga, by wyjściowa komórka śledziła 92 pojedyncze chromosomy (23 pary, z których każda uległa podwojeniu), skierowując do każdej gamety jeden kompletny zestaw chromosomów. Nie budzi więc zdziwienia, że zdarzają się, chociaż rzadko, pomyłki w segregacji chromosomów podczas mejozy. Na przykład zespół Downa, charakteryzujący się poważnym niedorozwojem umysłowym człowieka, jest wynikiem skierowania do gamety dodatkowej kopii chromosomu 21. Jeśli ta gameta uczestniczy w tworzeniu zygoty, to zarodek ma trzy kopie chromosomu 21 i po dwie kopie pozostałych chromosomów. Ten brak równowagi chromosomów powoduje zakłócenia rozwoju zarodka.

Mejoza jest źródłem olbrzymiej zmienności genetycznej

Jednakowe bliźnięta powstające z pojedynczej zygoty są genetycznie identyczne. W innych przypadkach bliźnięta nie są genetycznie takie same. Dzieje się tak dlatego, że nawet zanim nastąpi zapłodnienie, podczas mejozy zachodzą dwa rodzaje losowej segregacji materiału genetycznego.

Pierwszy z nich polega na tym, że chromosomy matczyne i ojcowskie ulegają przetasowaniu i są rozdzielane do gamet. Chociaż chromosomy są starannie dobierane, tak by każda gameta otrzymała jeden i tylko jeden zestaw chromosomów, jednak każda gameta otrzymuje przypadkową mieszaninę chromosomów ojcowskich i matczynych (rys. 9-36). Już w rezultacie samego przemieszania chromosomów pojedynczy osobnik w zasadzie może wytworzyć 2^n różnych gamet, gdzie n jest liczbą haploidalnych chromosomów. Na przykład każdy człowiek teoretycznie może wytworzyć $2^{23} = 8{,}4 \cdot 10^6$ różnych gamet w drodze przypadkowego rozdziału chromosomów, zachodzącego podczas mejozy.



Rys. 9-36. Redystrybucja chromosomów zachodząca podczas mejozy. Niezależna segregacja matczynych i ojcowskich homologów prowadzi do wytworzenia 2^n różnych haploidalnych gamet przez organizm zawierający n chromosomów. Tutaj $n = 3$ i dlatego może powstać 2^3, czyli 8 różnych gamet. Dla uproszczenia nie uwzględniono tu rekombinacji

Rzeczywista liczba różnych gamet, które każda osoba może wytworzyć, jest jednak znacznie większa niż wartość poprzednio wyliczona, ponieważ podczas mejozy zachodzą rekombinacje homologiczne. W każdej parze ludzkich chromosomów podczas mejozy dochodzi przeciętnie do jednego lub dwóch zdarzeń crossing-over. Proces ten prowadzi do lokowania się na tym samym chromosomie genów ojcowskich i matczynych, które poprzednio znajdowały się na oddzielnych chromosomach, co przedstawiono na rys. 9-35. Ponieważ rekombinacja zachodzi w bardziej lub mniej przypadkowych miejscach wzdłuż całego chromosomu, każdy jednostkowy proces mejozy powoduje powstawanie gamet o różnym składzie genetycznym.

Segregacja chromosomów podczas mejozy łącznie z rekombinacją homologiczną zachodzącą w rezultacie crossing-over stwarzają prawie nieograniczone źródło zmienności genetycznej w gametach wytwarzanych przez poszczególnego osobnika. Jeśli bierzemy pod uwagę, że każdy człowiek powstaje w wyniku zlewania się dwóch takich gamet, jednej pochodzącej od ojca i drugiej — od matki, bogactwo zmienności człowieka, jaką obserwujemy wokół nas, bynajmniej nie jest czymś zaskakującym.

Pytanie 9-7. Pomijając efekty rekombinacji, pojedynczy człowiek może w zasadzie wyprodukować $2^{23} = 8{,}4 \cdot 10^6$ genetycznie różnych gamet. Jaką część tych możliwości realizuje podczas przeciętnie długiego życia a) kobieta? b) mężczyzna?

Streszczenie

- Prostota budowy i krótki czas wytwarzania nowych pokoleń zadecydowały, że bakterie — szczególnie *E. coli* — należą do organizmów najlepiej poznanych na poziomie molekularnym.
- Rzadkie spontaniczne pomyłki podczas replikacji DNA stanowią dla bakterii ciągłe źródło wariantów genetycznych. Po zmianie warunków zewnętrznych, wariant genetyczny, który może najlepiej przetrwać w nowych warunkach, mnoży się i opanowuje populację.
- W komórkach bakteryjnych działają trzy mechanizmy uzyskiwania genów pochodzących z innych komórek populacji. Są to: koniugacja, transformacja i transdukcja (zachodząca za pośrednictwem fagów). Proces mieszania się zasobów genetycznych populacji jest ważnym źródłem zmienności genetycznej.
- Rekombinacja homologiczna jest procesem, dzięki któremu dwie dwuniciowe cząsteczki DNA o podobnej sekwencji nukleotydów mogą dokonywać wzajemnej wymiany fragmentów (crossing-over), tworząc cząsteczki DNA o nowych sekwencjach.
- Transpozony są sekwencjami DNA, które mogą przemieszczać się z miejsca na miejsce w genomie gospodarza. Przemieszczanie to prowadzi do zmian w genomie gospodarza i stanowi dodatkowe źródło zmienności genetycznej.
- Wiele spośród mechanizmów powodujących zmienność genetyczną bakterii działa także w odniesieniu do genomów eukariotycznych. Genomy eukariotyczne mają jednak kilka dodatkowych cech, które ułatwiły ich zmiany ewolucyjne.
- U eukariotów nierówny (niesymetryczny) crossing-over może prowadzić do duplikacji genów, co jak się przypuszcza, utworzyło rodziny podobnych genów obecnie występujące w genomach eukariotycznych. Nierówny crossing-over jest przypuszczalnie także jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za duplikację eksonów, prowadzącą do tworzenia białek złożonych z powtarzających się krótkich domen.
- Trzydzieści procent genomu człowieka stanowią sekwencje DNA wielokrotnie powtórzone. Około jednej trzeciej takich powtarzających się sekwencji (~ 10% całego genomu) stanowią dwa elementy o charakterze transpozonów, które występują w genomie w szczególnie dużej liczbie kopii.
- Jeden z rodzajów transpozonów znajdywanych w genomach eukariotycznych przemieszcza się poprzez intermediaty RNA. Ten rodzaj transpozonów nosi nazwę retrotranspozonów,
- Transpozony prawdopodobnie są odpowiedzialne za wiele zmian ewolucyjnych, które doprowadziły do ukształtowania się genomów współczesnych eukariotów. Transpozycje są jednym z mechanizmów tasowania eksonów, czyli łączenia się eksonów podczas ewolucji w sposób umożliwiający wytwarzanie nowych białek, zbudowanych przez sklejanie ze sobą domen występujących już wcześniej w innych białkach.
- Wirusy to niewiele więcej niż geny upakowane w chroniące je kapsydy. Mogą się rozmnażać tylko wewnątrz komórek odpowiedniego gospodarza.
- Genomy niektórych wirusów są zbudowane z RNA, a nie z DNA. Jedna grupa RNA wirusów — retrowirusy, aby się namnażać, musi przepisać swój genom RNA na DNA.
- Retrowirusy noszące onkogeny mogą spowodować przekształcenie się zakażonych komórek w komórki nowotworowe.
- Rozmnażanie płciowe polega na cyklicznych zmianach stadiów diploidalnego i haploidalnego. W procesie mejozy dzielące się komórki diploidalne tworzą haploidalne gamety, z kolei haploidalne gamety pochodzące od dwóch osobników w procesie zapłodnienia łączą się, tworząc nową komórkę diploidalną.
- Podczas mejozy matczyne i ojcowskie chromosomy komórki diploidalnej są kierowane do gamet w taki sposób, że każda gameta uzyskuje tylko jedną kopię każdego z chromosomów. Ponieważ segregacja każdej pary chromosomów homologicznych dokonuje się w sposób przypadkowy, pojedynczy osobnik może wytworzyć wiele genetycznie różnych gamet.
- Crossing-over sprzyja tasowaniu genów zachodzącemu podczas mejozy przez wymianę genów między chromosomami homologicznymi.
- Rozmnażanie płciowe jest ewolucyjnie korzystne, gdyż przypadkowe mieszanie się informacji genetycznej zwiększa prawdopodobieństwo, że przynajmniej część potomstwa przetrwa w nieprzewidywalnie zmieniającym się środowisku.

Hasła

integracja	onkogen	rekombinacja zlokalizowana	transformacja
jajo	plazmid	retrotranspozon	transpozon
komórka zarodkowa	plemnik	retrowirus	transpozycja
koniugacja bakterii	protoonkogen	tasowanie eksonów	wirus
mejoza	rekombinacja homologiczna	transdukcja	wirus rakotwórczy

Pytania

Pytanie 9-8. Które z poniższych twierdzeń są prawdziwe? Uzasadnij odpowiedź.

A. Komórki jajowe i plemniki zwierząt zawierają haploidalne genomy.

B. Podczas mejozy chromosomy zostają rozmieszczone w taki sposób, że każda potomna komórka uzyskuje tylko jedną kopię każdego z chromosomów.

C. Mutacje, które powstają podczas mejozy, nie są przenoszone na następne pokolenie.

D. Komórki mogą pobierać DNA z otoczenia i w niektórych przypadkach dochodzi do ekspresji genów zawartych w takim DNA.

E. Wirusy zintegrowane z chromosomem gospodarza ulegają replikacji wraz z jego genomem. W każdej komórce może dlatego powstać tylko jedna cząstka dojrzałego wirusa.

F. Retrowirusy zawierają wewnątrz kapsydu odwrotną transkryptazę.

G. Podczas crossing-over w czasie mejozy jednakowe geny zawarte na dwóch chromosomach muszą łączyć się w pary.

H. Kapsydy wirusów mogą być zrobione albo z DNA, albo z RNA.

Pytanie 9-9. Jakie korzyści dla organizmu wynikają z diploidalności jego genomu? Dlaczego jest to niekorzystne dla genetyków, chcących badać ten organizm? Dlaczego dla reprodukcji diploidalnego organizmu korzystne jest wytwarzanie haploidalnych gamet?

Pytanie 9-10. Uderzające jest, że prawie wszystkie współczesne organizmy ewoluowały poprzez kolejne pokolenia rozmnażające się raczej płciowo niż bezpłciowo. Organizmy rozmnażające się wyłącznie bezpłciowo, chociaż obfite na Ziemi, pozostały stosunkowo proste. Na przykład prawie wszystkie z nich są jednokomórkowe. Jakie są tego powody?

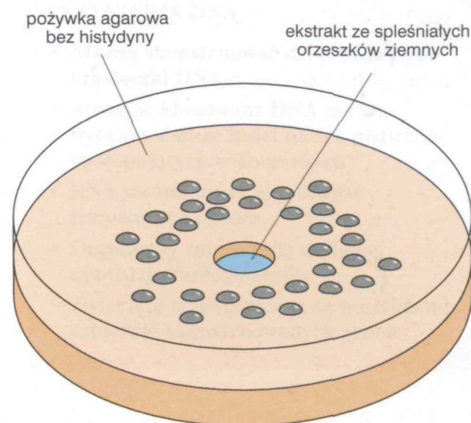
Pytanie 9-11. Przedyskutuj następujące twierdzenie: „Wirusy są pasożytami. Są szkodliwe dla organizmu gospodarza i plasują go dlatego w sytuacji ewolucyjnie niekorzystnej."

Pytanie 9-12. Rozważmy następujący eksperyment: Na płytkę z agarem, zawierającą wszystkie niezbędne składniki odżywcze z wyjątkiem histydyny, posiano milion bakterii zawierających szkodliwą mutację w genie koniecznym do syntezy tego aminokwasu. Zgodnie z oczekiwaniem, po jednym dniu inkubacji w temp. 37°C nie zauważono jakiegokolwiek wzrostu bakterii. Na środku płytki umieszczono następnie małą kropelkę sterylnego ekstraktu ze spleśniałych orzeszków ziemnych i płytkę ponownie umieszczono w inkubatorze. Ku zdziwieniu obserwatorów, dwa dni później znaleziono pierścień kolonii, otaczających miejsce nakroplenia ekstraktu (rys. P9-12). Gdy pobrano bakterie z jakiejkolwiek spośród tych kolonii i nałożono na nową płytkę (identyczną z płytką poprzednio opisaną, ale bez ekstraktu z orzeszków), to rozwijały się, tworząc nowe kolonie. Zaproponuj wyjaśnienie tych wyników. Rozważ następujące kwestie:

A. Dlaczego niektóre z bakterii rozwijały się i tworzyły kolonie?

B. Co było powodem, że rosnące bakterie utworzyły pierścień kolonii wokół nałożonej kropli, w pewnej odległości od niej?

C. Ile bakterii, spośród wysianych na płytkę, rozwinęło się w kolonie otaczające nałożoną kroplę ekstraktu?



Rys. P9-12

Pytanie 9-13. Wymień niektóre różnice między plazmidami a wirusami.

Pytanie 9-14. W tym rozdziale pokazujemy, że zmienność genetyczna jest korzystna dla gatunku, ponieważ zwiększa jego zdolność adaptacji do zmieniających się warunków. Dlaczego zatem w każdej komórce działa mechanizm zapewniający w dużym stopniu wierność replikacji DNA?

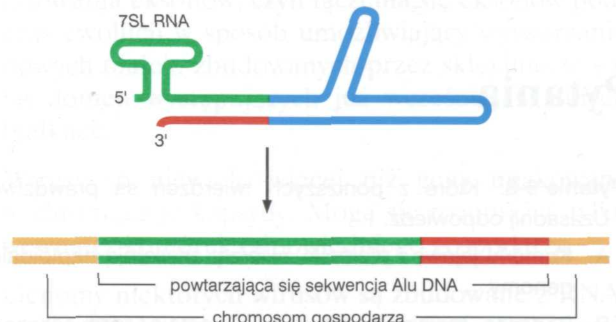
Pytanie 9-15. Co twoim zdaniem stałoby się z informacyjnymi RNA, gdyby w cytoplazmie komórek zwierzęcych było dużo odwrotnej transkryptazy?

Pytanie 9-16. Skomentuj następujące twierdzenie: „Wirusy istnieją w szarej strefie życia: poza komórką są martwymi zbiorami cząsteczek, wewnątrz komórek są jednak żywe."

Pytanie 9-17. Sekwencje DNA ulegające transpozycji, takie jak sekwencje Alu, występują w genomie człowieka w wielokrotnych kopiach. W jaki sposób obecność sekwencji Alu mogłaby wpływać na znajdujący się w jej pobliżu gen?

Pytanie 9-18. Załóżmy, że jakiś mRNA w komórce zwierzęcej uległ odwrotnej transkrypcji do DNA (bardzo rzadki przypadek, w zajściu którego może pomagać infekcja wirusowa wirusem kodującym odwrotną transkryptazę). Przyjmijmy, że utworzony dwuniciowy DNA został zintegrowany z chromosomem w miejscu innym niż zajmowane przez oryginalny gen. Czym różniłaby się sekwencja takiego DNA (nazwijmy ją pseudogenem) od oryginalnego genu, z którego powstał mRNA? Czy pseudogen ulegałby transkrypcji?

Pytanie 9-19. Rodzina silnie powtarzających się sekwencji Alu występuje wyłącznie w genomach ssaków. Ewolucyjnym przodkiem rodziny Alu jest mały gen, kodujący strukturalny RNA zwany 7SL RNA, występujący we wszystkich komórkach eukariotycznych (bierze on udział w kierowaniu białek do ich miejsc przeznaczenia w komórce, co omawia rozdz. 14). RNA ten przybiera drugorzędową strukturę, którą pokazano na rys. P9-19; odcinki zaznaczone kolorem *zielonym* i *czerwonym* mają sekwencje podobne do powtarzających się w DNA sekwencji Alu. Czy możesz zaproponować mechanizm wyjaśniający krok po kroku, jak sekwencje Alu mogły się utworzyć podczas ewolucji? Dla każdego z proponowanych etapów należy wskazać, czy jest on oparty na reakcjach zachodzących we współczesnych komórkach, czy też na reakcjach, których przebieg należy dopiero przypuszczać.



Rys. P9-19

Pytanie 9-20. Przypuśćmy, że jakiś gatunek rozmnażający się płciowo zawiera tylko cztery chromosomy, z których każdy podczas mejozy może wykazywać crossover zaledwie w trzech specyficznych miejscach. Ile genetycznie różnych gamet mogą wytworzyć przedstawiciele tego gatunku?

10
Technologia DNA

JAK BADA SIĘ CZĄSTECZKI DNA

- Nukleazy restrykcyjne rozcinają cząsteczki DNA w specyficznych miejscach
- Elektroforeza żelowa umożliwia rozdział fragmentów DNA różniących się wielkością
- Określanie sekwencji nukleotydowej fragmentów DNA

HYBRYDYZACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH

- Hybrydyzacja DNA ułatwia prenatalne diagnozowanie chorób genetycznych
- Hybrydyzacja *in situ* pozwala zlokalizować sekwencję kwasu nukleinowego w komórce lub w odpowiednim rejonie chromosomu

KLONOWANIE DNA

- Ligaza DNA łącząc fragmenty DNA tworzy cząsteczkę zrekombinowanego DNA
- Do klonowania DNA można wykorzystać plazmidy bakteryjne
- Geny człowieka izoluje się przez klonowanie
- Biblioteki cDNA odpowiadają mRNA wytwarzanym w określonych tkankach
- Hybrydyzacja umożliwia identyfikację genów nawet odlegle spokrewnionych
- Łańcuchowa reakcja polimeryzacji powiela wybrane sekwencje DNA

INŻYNIERIA DNA

- Można skonstruować całkowicie nowe cząsteczki DNA
- Stosując klonowany DNA można wytwarzać duże ilości białek nielicznie występujących w komórkach
- RNA można uzyskać w drodze transkrypcji *in vitro*
- Organizmy zmutowane najlepiej ujawniają funkcje genów
- Zwierzęta transgeniczne są nosicielami sztucznie skonstruowanych genów

Od tysięcy lat ludzie prowadzili eksperymenty z DNA, nie zdając sobie w ogóle z tego sprawy. Na przykład współczesne odmiany róż ogrodowych są wynikiem doboru hodowlanego trwającego całe wieki, dla którego punktem wyjścia były dzikie gatunki róż (rys. 10-1A). Istotnym momentem w hodowli róż było przywiezienie (przez kupców) z Chin do Europy w latach 1790. czterech odmian róż, które następnie krzyżowano z odmianami europejskimi. Genomy róż hodowanych w najnowszych czasach pochodzą więc zarówno od gatunków chińskich, jak i europejskich. Przemieszanie się materiału genetycznego tych gatunków zapewne nigdy nie miałoby miejsca, gdyby nie interwencja człowieka. Innym ewidentnym wynikiem długiej serii eksperymentów z DNA jest duża rozmaitość ras psów, z którą współcześnie się spotykamy. Szary wilk — przodek obecnego psa został udomowiony około 10000–15000 lat temu. Wielkość, barwa futra, kształt i nawet zachowania się różnych ras są rezultatem prowadzonych od tamtych czasów celowych doświadczeń hodowlanych z doborem stosownym do oczekiwanych cech (rys. 10-1B).

Chociaż hodowlę i dobór roślin uprawnych i zwierząt domowych prowadzono od czasów prehistorycznych, jednak dopiero 25 lat temu zaczęła się technologiczna rewolucja, która w radykalny sposób zwiększyła praktyczne znaczenie i rangę manipulowania DNA. We wczesnych latach siedemdziesiątych spośród wielu milionów par nukleotydów zawartych w typowym chromosomie po raz pierwszy wyizolowano określony odcinek DNA. Umożliwiło to tworzenie w probówce nowych cząsteczek DNA i wprowadzanie ich z powrotem do żywego organizmu. Osiągnięcia te, nazywane inżynierią genetyczną, składaniem genów, rekombinacyjną technologią DNA lub krótko technologią DNA, umożliwiają tworzenie chromosomów z taką kombinacją genów, która nigdy nie powstałaby w drodze


(A)


(B)

Rys. 10-1. Wczesne eksperymenty z DNA. (A) Najstarszy obraz róży znany sztuce Zachodu, pochodzący z pałacu Knossos na Krecie z roku ok. 2000 przed Chrystusem. Współczesne róże są rezultatem wielu wieków hodowli (doboru i krzyżowania) takich dzikich róż. (B) Znaczenie hodowli różnych ras psów mogą ilustrować pudel i mops. Wszystkie psy, niezależnie od rasy, należą do jednego gatunku. (B dzięki uprzejmości: Heather Angel)

naturalnej. Nowe techniki umożliwiają oczywiście także takie manipulacje genami, jakie zachodziłyby w warunkach naturalnych, ale czas potrzebny do ich przypadkowego zaistnienia byłby liczony w tysiącach lat.

W okresie przed rewolucją technologiczną lat siedemdziesiątych DNA był jedną z cząsteczek, których analiza sprawiała biochemikom najwięcej trudności. Nawet w bakteryjnych chromosomach cząsteczki DNA są niezwykle długie (na przykład chromosom bakteryjny *E. coli* zawiera 4,6 milionów nukleotydów), a chromosomy komórek eukariotycznych są wielokrotnie większe. Ponieważ w skład DNA wchodzą tylko cztery rodzaje zasad, z punktu widzenia dostępnych wówczas technik analizy — DNA jawił się jako cząsteczka pozbawiona takich cech, które umożliwiłyby odróżnienie jednej części genomu od drugiej. Najistotniejszej cechy poszczególnych odcinków DNA — ich sekwencji nukleotydowej nie można było oznaczyć w sposób bezpośredni.

Dzisiaj sytuacja ta uległa całkowitej zmianie. DNA stał się jedną z makrocząsteczek najłatwiejszych do zbadania. Obecnie nawet początkujący student może wyciąć z genomu rejon DNA zawierający określony gen, uzyskać dowolną liczbę dokładnych jego kopii i określić ich sekwencję nukleotydową z szybkością tysięcy nukleotydów w ciągu jednego dnia. Różne warianty tych technik pozwalają w laboratorium zmienić wyizolowany gen w określony sposób i wprowadzić z powrotem do komórek (hodowanych w formie kultur komórkowych) w celu wyjaśnienia, jakie funkcje ten gen pełni w żywym organizmie. Stosując bardziej wymyślne techniki można zmieniony gen wprowadzać do zwierząt lub do roślin w taki sposób, by stał się funkcjonalnym i dziedzicznym elementem genomu danego organizmu.

W tym rozdziale dokonamy przeglądu podstawowych metod stosowanych w nowej dziedzinie, jaką jest **rekombinacyjna technologia DNA**. Ten techniczny przełom miał niezwykle istotny wpływ na biologię komórki we wszystkich jej aspektach, gdyż umożliwił badanie komórek i ich makrocząsteczek w sposób poprzednio niewyobrażalny. Techniki te pozwoliły osiągnąć obecny stan wiedzy o organizacji i historii ewolucji złożonych genomów eukariotycznych (co przedstawiono w rozdz. 9) i doprowadziły do wykrycia całych nowych klas genów i białek. Dostarczają też skutecznych sposobów określania funkcji białek i funkcji poszczególnych domen białkowych, ujawniając istniejące między nimi duże i nieoczekiwane zależności. Dla biologów stanowią również narzędzia do ujawniania mechanizmów regulacji ekspresji genów w komórkach eukariotycznych.

Obecnie znana jest kompletna sekwencja nukleotydowa genomu organizmu eukariotycznego — jednokomórkowych drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz całkowita sekwencja genomów kilku bakterii i archebakterii. Spodziewamy się, że w ciągu dekady zostanie poznana kompletna sekwencja naszego własnego genomu. To ostatnie osiągnięcie pozwoli poznać całą instrukcję genetyczną formowania człowieka, choć będzie trzeba wielu dekad dalszych badań, aby dokładnie zrozumieć, w jaki sposób komórki interpretują tę instrukcję.

Rekombinacyjna technologia DNA wywiera też znaczący wpływ na życie ludzkie w wielu aspektach innych niż badania naukowe: wykorzystuje się ją w medycynie — do wykrywania mutacji odpowiedzialnych za choroby wrodzone (dziedziczne); w praktyce sądowej — do identyfikacji osobników, w tym podejrzanych o zbrodnie; w farmacji — w coraz szerszym zakresie do produkcji leków, łącznie z insuliną potrzebną diabetykom i białkowym czynnikiem krzepliwości krwi (czynnikiem VIII) dla osób cierpiących na hemofilię. Nawet nasze proszki do prania, zawierające termostabilne proteazy trawiące resztki jedzenia lub plamy krwi, wytwarza się na podstawie produktów technologii DNA. Największy wpływ na nasze życie codzienne będą prawdopodobnie miały te spośród wszystkich odkryć opisanych w tej książce, które osiągnięto dzięki rekombinacyjnej technologii DNA.

W pierwszej części tego rozdziału omówimy podstawowe metody analizowania DNA. Następnie przedstawimy, w jaki sposób można izolować określone odcinki DNA i namnażać je w dużych ilościach za pomocą technik *klonowania* DNA lub *łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR)*. W ostatniej części rozdziału dokonamy przeglądu zastosowań technologii DNA w inżynierii genetycznej, to jest w genetycznym manipulowaniu komórkami i całymi organizmami.

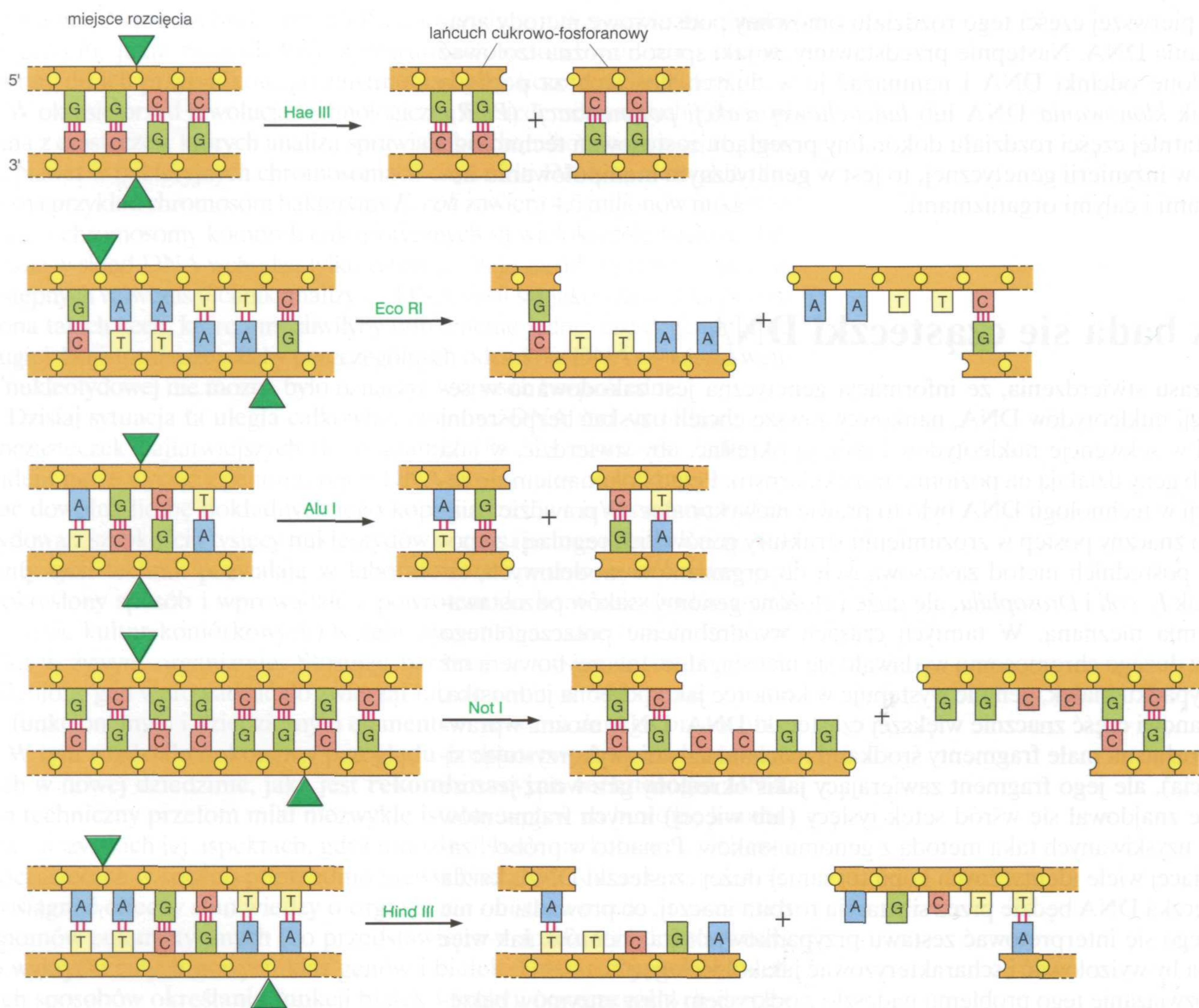
Jak bada się cząsteczki DNA

Od czasu stwierdzenia, że informacja genetyczna jest zakodowana w sekwencji nukleotydów DNA, naukowcy zawsze chcieli uzyskać bezpośredni wgląd w sekwencje nukleotydów i móc ją określać, aby stwierdzić, w jaki sposób geny działają na poziomie molekularnym. Przed dokonaniem się rewolucji w technologii DNA było to prawie niewykonalne. Wprawdzie osiągnięto znaczny postęp w zrozumieniu struktury genów i ich regulacji za pomocą pośrednich metod zastosowanych do organizmów modelowych, takich jak *E. coli* i *Drosophila*, ale duże i złożone genomy ssaków pozostawały ziemią nieznaną. W tamtych czasach wyodrębnienie poszczególnego genu z dużego chromosomu wydawało się nieosiągalne. Inaczej bowiem niż w przypadku białek, gen nie występuje w komórce jako odrębna jednostka, ale stanowi część znacznie większej cząsteczki DNA. DNA można wprawdzie rozbić na małe fragmenty środkami mechanicznymi (wykorzystując siły tarcia), ale jego fragment zawierający jakiś określony gen wciąż jeszcze będzie znajdował się wśród setek tysięcy (lub więcej) innych fragmentów DNA uzyskiwanych taką metodą z genomu ssaków. Ponadto w próbce, zawierającej wiele identycznych kopii tej samej dużej cząsteczki DNA, każda cząsteczka DNA będzie przez siły tarcia rozbita inaczej, co prowadzi do nie dającego się interpretować zestawu przypadkowych fragmentów. Jak więc można by wyizolować i scharakteryzować jakikolwiek gen?

Rozwiązanie tego problemu nadeszło z odkryciem klasy enzymów bakteryjnych, obecnie znanych jako *nukleazy restrykcyjne*. Nukleazy są to enzymy, które katalizują hydrolizę wiązań fosfodiestrowych w kwasach nukleinowych. Ale nukleazy restrykcyjne mają właściwości, które odróżniają je od innych nukleaz: rozcinają one DNA tylko w pewnych miejscach, określonych przez krótkie sekwencje nukleotydów. Dlatego nukleazy restrykcyjne można wykorzystać do uzyskania zestawu specyficznych fragmentów genomu. Obecną część rozdziału rozpoczniemy od opisu działania tych enzymów i sposobu rozdzielania fragmentów DNA uzyskanych tą metodą. Następnie przedstawimy sposób ustalania w nich kolejności (sekwencji) nukleotydów.

Nukleazy restrykcyjne rozcinają cząsteczki DNA w specyficznych miejscach

Podobnie jak większość narzędzi stosowanych w technologii DNA, nukleazy restrykcyjne odkryli badacze zajmujący się szczególnym problemem biologicznym, stanowiącym przedmiot ich zainteresowania. Zauważono mianowicie, że niektóre bakterie zawsze degradowały DNA pochodzący z innych bakterii, który był do nich eksperymentalnie wprowadzony za pomocą metod omówionych w rozdz. 9. Badanie przyczyn tej degradacji ujawniło nową klasę enzymów zawartych wewnątrz komórek bakterii będących gospodarzem wprowadzanego DNA. Najistotniejsza cecha tych enzymów polegała na ich zdolności do rozcinania DNA tylko w miejscach występowa-



nia określonych sekwencji nukleotydowych. Własny DNA tych bakterii był chroniony przed rozcinaniem przez chemiczne modyfikacje tych samych sekwencji. Ponieważ enzymy te wprowadzały ograniczenia (restrykcje) w przenoszeniu DNA pomiędzy niektórymi szczepami bakterii, nazwano je **nukleazami restrykcyjnymi**. Różne szczepy bakterii zawierają różne nukleazy restrykcyjne, z których każda rozcina DNA przy innych, specyficznych dla siebie sekwencjach nukleotydów.

Nukleazy restrykcyjne wykorzystywane w technologii DNA pochodzą głównie z bakterii, a ponieważ rozpoznawane przez nie sekwencje są krótkie — na ogół od 4 do 8 par nukleotydów, występują w sposób czysto losowy w każdej długiej cząsteczce DNA. Nukleazy restrykcyjne mogą być dzięki temu wykorzystane do analizy DNA z dowolnego źródła. Enzymy te, istotne dla technologii DNA, obecnie są dostępne w handlu i można zamawiać je i otrzymywać normalnie jako przesyłki pocztowe; przeciętny handlowy katalog wymienia ponad 100 restryktaz, z których każda rozcina inną sekwencję DNA. Kilka przykładów takich sekwencji przedstawia rys. 10-2.

Zdolność do rozcinania DNA w specyficznych miejscach decyduje, że nukleazy restrykcyjne są niezwykle istotne we współczesnej technologii DNA. Źródło ich użyteczności tkwi w tym, że określony enzym restrykcyjny zawsze rozcina daną cząsteczkę DNA w tym samym miejscu. Tak więc próbka DNA, pochodząca na przykład z tkanki ludzkiej, poddana działaniu określonej nukleazy restrykcyjnej zawsze daje ten sam zestaw fragmentów DNA.

Rys. 10-2. Sekwencje nukleotydowe rozpoznawane i rozcinane przez pięć powszechnie stosowanych nukleaz restrykcyjnych. Miejsca rozpoznawane i rozcinane przez poszczególne enzymy różnią się sekwencją nukleotydową i długością. Te docelowe sekwencje często są palindromowe (to znaczy, że sekwencje nukleotydowe są symetryczne względem środkowego punktu). W podanych przykładach obydwie nici DNA są rozcinane w specyficznych miejscach rozpoznawanej sekwencji. Niektóre enzymy, jak Hae III i Alu I, rozcinają dwuniciowy DNA poprzecznie „pod kątem prostym", tworząc tępe końce rozciętej cząsteczki DNA. Inne nukleazy, np. Eco RI, Not I lub Hind III, rozcinają DNA „na ukos" i tworzą końce kohezyjne (jedna nić helisy DNA wystaje o kilka nukleotydów przed drugą). Nukleazy restrykcyjne zwykle otrzymuje się z bakterii; nazwy enzymów są skrótami nazw bakterii stanowiących ich źródło, na przykład enzym Eco RI pochodzi z *Escherichia coli*

5'-AAGAATTGCGGAATTCGAGCTTAAGGGCCGCGCCGAAGCTTTAAA-3'
3'-TTCTTAACGCCTTAAGCTCGAATTCCCGGCGCGGCTTCGAAATTT-5'

Pytanie 10-1. Jakie produkty powstaną gdy, pokazany obok odcinek dwuniciowego DNA zostanie trawiony:

A. EcoRI.

B. Alu I.

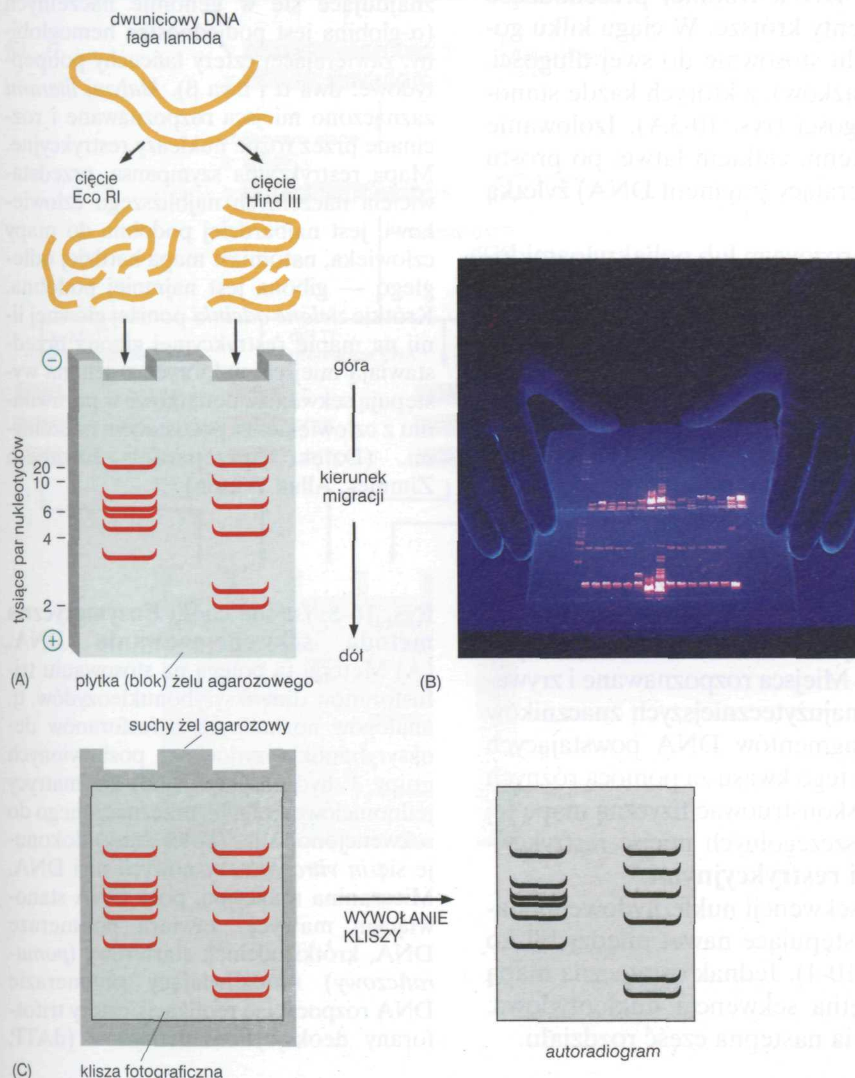
C. Not I.

D. wszystkimi trzema enzymami na raz?

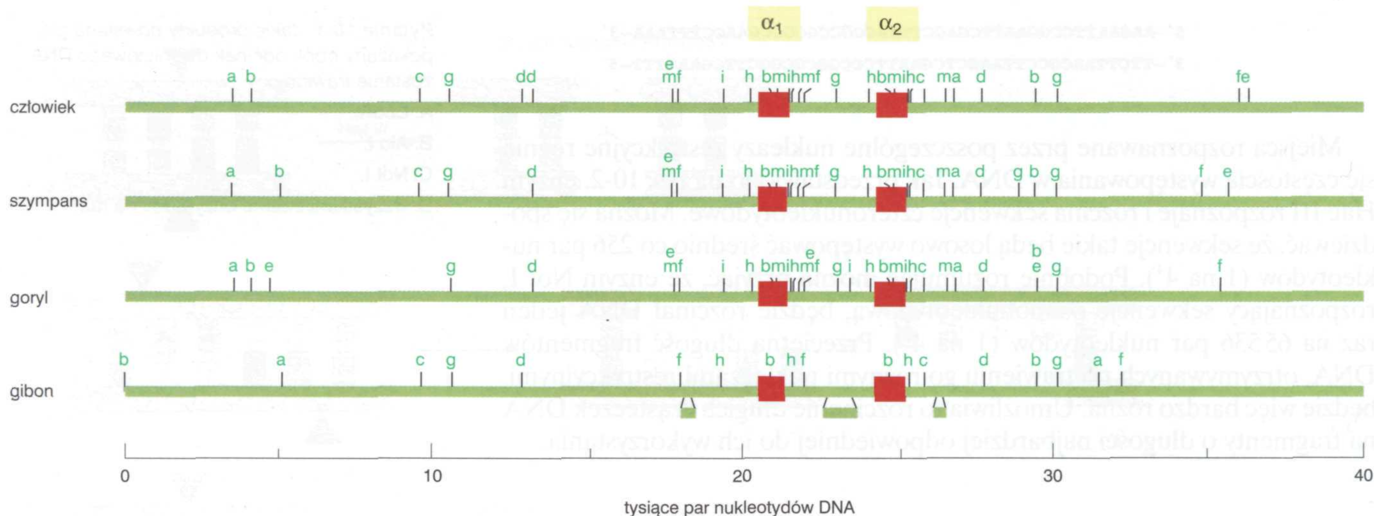
Miejsca rozpoznawane przez poszczególne nukleazy restrykcyjne różnią się częstością występowania w DNA. Jak przedstawiono na rys. 10-2, enzym Hae III rozpoznaje i rozcina sekwencje czteronukleotydowe. Można się spodziewać, że sekwencje takie będą losowo występować średnio co 256 par nukleotydów (1 na 4^4). Podobnie rozumując można przyjąć, że enzym Not I, rozpoznający sekwencję ośmionukleotydową, będzie rozcinał DNA jeden raz na 65536 par nukleotydów (1 na 4^8). Przeciętna długość fragmentów DNA, otrzymywanych po trawieniu go różnymi nukleazami restrykcyjnymi, będzie więc bardzo różna. Umożliwia to rozcinanie długich cząsteczek DNA na fragmenty o długości najbardziej odpowiedniej do ich wykorzystania.

Elektroforeza żelowa umożliwia rozdział fragmentów DNA różniących się wielkością

Po rozcięciu długich cząsteczek DNA na mniejsze odcinki za pomocą nukleaz restrykcyjnych, otrzymane fragmenty należy rozdzielić. Zwykle dokonuje się tego za pomocą elektroforezy żelowej, podczas której frag-



Rys. 10-3. Rozdział cząsteczek DNA według wielkości metodą elektroforezy żelowej i ich wykrywanie. (A) Schemat ten porównuje rozcięcie tej samej cząsteczki DNA (w tym przypadku genomu bakteriofaga lambda; patrz rys. 9-15) za pomocą dwóch różnych nukleaz restrykcyjnych — Eco RI (*po lewej*) i Hind III (*po prawej*). Uzyskane fragmenty następnie rozdziela się przez elektroforezę żelową. Mieszaninę fragmentów DNA uzyskanych po trawieniu restryktazami nakłada się do „kieszonek" na górze cienkiej płyty żelu. Pod wpływem pola elektrycznego fragmenty migrują poprzez żel do elektrody dodatniej. Fragmenty większe migrują w żelu wolniej niż fragmenty małe. Mówimy dlatego, że fragmenty zawarte w mieszaninie rozdzielają się według wielkości. Na przykład dwa pasma najszybciej migrujące w prawej ścieżce odpowiadają najmniejszym fragmentom powstającym w wyniku trawienia DNA faga λ za pomocą restryktazy Hind III. (B) Aby uwidocznić pasma DNA, żel nasycono roztworem barwnika, który wiąże się z DNA i silnie fluoryzuje po naświetleniu światłem UV. (C) Inną metodą wizualizacji pasm DNA jest autoradiografia. Przed trawieniem enzymami restrykcyjnymi DNA wyznakowano radioizotopem ^{32}P, zastępując niektóre niepromieniotwórcze atomy fosforu atomami radioaktywnymi, ^{32}P. Można to osiągnąć na przykład przez replikację wirusa w obecności ^{32}P. Cząstki β emitowane przez ^{32}P, trafiając na kliszę fotograficzną przyłożoną do żelu, powodują jej naświetlenie. Po wywołaniu kliszy widoczne są na niej ciemne pasma odpowiadające położeniu pasm (prążków) DNA w żelu (B dzięki uprzejmości: J.C. Revy, Science Photo Library)



menty DNA rozdzielają się według długości. Mieszaninę fragmentów DNA nakłada się na jeden koniec płytki żelu agarozowego lub poliakryloamidowego, zawierającego sieć mikroskopijnych kanalików. Następnie do obu końców żelu przykłada się napięcie. Ponieważ DNA ma ujemny ładunek elektryczny, fragmenty nałożone na żel migrują do dodatnio naładowanej elektrody. Dłuższe fragmenty DNA, trudniej przechodzące przez sieć żelu, migrują wolniej niż fragmenty krótsze. W ciągu kilku godzin fragmenty DNA rozdzielają się w żelu stosownie do swej długości, tworząc „drabinkę" oddzielnych pasm (prążków), z których każde stanowi kolekcję cząsteczek o jednakowej długości (rys. 10-3A). Izolowanie określonego fragmentu DNA jest dzięki temu całkiem łatwe: po prostu wycina się odpowiedni kawałek żelu (zawierający fragment DNA) żyletką lub skalpelem.

Aby uwidocznić pasma DNA w żelu agarozowym lub poliakryloamidowym, DNA należy wyznakować lub w jakiś sposób wybarwić. Jedną z czułych metod wybarwiania DNA jest traktowanie go barwnikiem, który po związaniu się z DNA silnie fluoryzuje w świetle UV (rys. 10-3B). Jeszcze bardziej czuła metoda uwidaczniania DNA polega na wprowadzeniu do cząsteczek DNA radioizotopu jeszcze przed ich elektroforezą. Często w tym celu jest wykorzystywany ^{32}P, gdyż można go łatwo wprowadzić do DNA i ponieważ izotop ten emituje cząstki o energii umożliwiającej łatwe wykrycie go metodą autoradiografii (rys. 10-3C).

Jednym z najwcześniejszych zastosowań trawienia DNA za pomocą nukleaz restrykcyjnych i rozdzielania powstałych fragmentów było konstruowanie *fizycznych map* niewielkich regionów DNA. Fizyczne mapowanie DNA polega na określeniu położenia różnych elementów znacznikowych (kamieni milowych) wzdłuż jego cząsteczki. Miejsca rozpoznawane i zrywane przez nukleazy restrykcyjne należą do najużyteczniejszych znaczników tego typu. Przez porównanie długości fragmentów DNA powstających w rezultacie trawienia określonej cząsteczki tego kwasu za pomocą różnych kombinacji nukleaz restrykcyjnych, można skonstruować fizyczną mapę tej cząsteczki, ujawniającą rozmieszczenie poszczególnych miejsc restrykcyjnych. Mapy takie zostały nazwane **mapami restrykcyjnymi**.

Ponieważ mapa restrykcyjna zależy od sekwencji nukleotydowej badanego DNA, może ona ujawnić różnice występujące nawet między blisko spokrewnionymi cząsteczkami DNA (rys. 10-4). Jednak ostateczną mapą fizyczną jakiegoś DNA jest jego kompletna sekwencja nukleotydowa. Sposób określania tej sekwencji przedstawia następna część rozdziału.

Rys. 10-4. **Porównanie map restrykcyjnych DNA zawierających zespoły genów α-globinowych człowieka i innych naczelnych.** *Zielone linie* przedstawiają chromosomowy DNA zawierający dwa geny α-globiny (*czerwone prostokąty*) znajdujące się w genomie naczelnych (α-globina jest podjednostką hemoglobiny, zawierającej cztery łańcuchy polipeptydowe: dwa α i dwa β). *Małymi literami* zaznaczono miejsca rozpoznawane i rozcinane przez różne nukleazy restrykcyjne. Mapa restrykcyjna szympansa, przedstawiciela naczelnych najbliższego człowiekowi, jest najbardziej podobna do mapy człowieka, natomiast mapa bardziej odległego — gibona jest najmniej podobna. Krótkie *zielone odcinki* poniżej głównej linii na mapie restrykcyjnej gibona przedstawiają miejsca, w których u gibona występują sekwencje dodatkowe w porównaniu z człowiekiem i pozostałymi naczelnymi. (Dzięki uprzejmości: Elizabeth Zimmer, Allan Wilson)

Rys. 10-5. *(strona obok)* **Enzymatyczna metoda sekwencjonowania DNA.** (A) Metoda ta polega na stosowaniu trifosforanów dideoksyrybonukleozydów, tj. analogów normalnych trifosforanów deoksyrybonukleozydów — pozbawionych grupy 3′ hydroksylowej. (B) Na matrycy jednoniciowego DNA przeznaczonego do sekwencjonowania (kolor *szary*) dokonuje się *in vitro* syntezy nowych nici DNA. Mieszanina reakcyjna, poza DNA stanowiącym matrycę, zawiera polimerazę DNA, krótki odcinek starterowy (*pomarańczowy*) umożliwiający polimerazie DNA rozpoczęcie replikacji, cztery trifosforany deoksyrybonukleozydów (dATP,

(A)

trifosforan deoksyrybonukleozydu

trifosforan dideoksyrybonukleozydu

zasada

5'

3' OH

umożliwia wydłużanie łańcucha w kierunku 3'

przeciwdziała wydłużaniu łańcucha w kierunku 3'

(B)

normalne prekursorowe trifosforany deoksyrybonukleozydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

niewielka ilość jednego trifosforanu dideoksyrybonukleozydu (ddATP)

rzadko zachodzące włączanie dideoksyrybonukleozydu przez polimerazę DNA blokuje dalsze wydłużanie DNA

oligonukleotydowy starter syntezy DNA

5' GCTACCTGCATGGA

3' CGATGGACGTACCTCTGAAGCG 5'

jednoniciowa cząsteczka DNA do zsekwencjonowania

(C)

5' GCATATGTCAGTCCAG 3'
3' CGTATACAGTCAGGTC 5'
dwuniciowy DNA

znakowany starter
5' GCAT 3'
3' CGTATACAGTCAGGTC 5'
jednoniciowy DNA

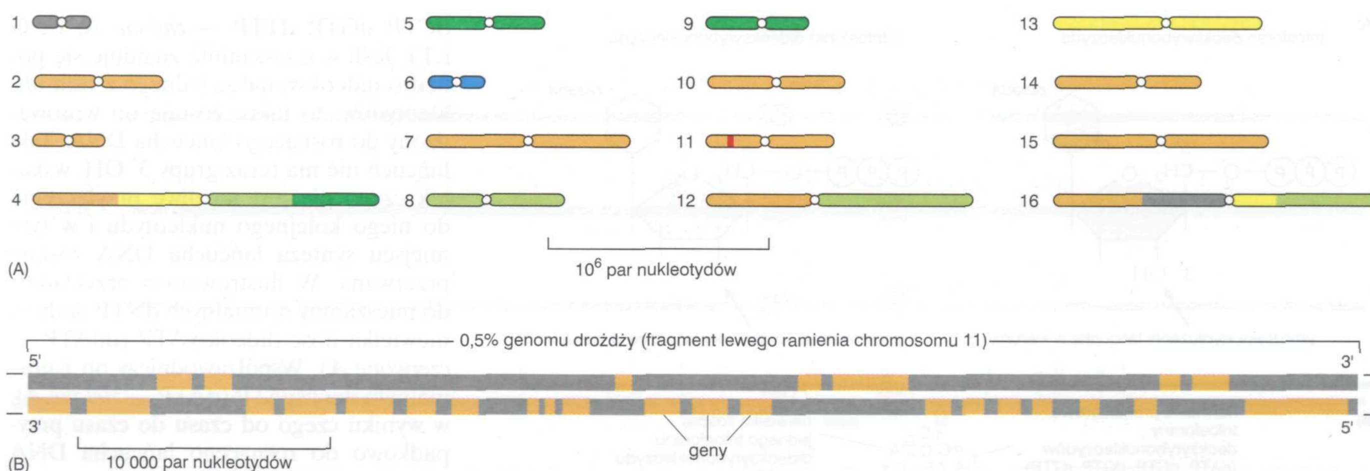
+ nadmiar dATP dTTP dCTP dGTP

+ ddATP + polimeraza DNA	+ ddTTP + polimeraza DNA	+ ddCTP + polimeraza DNA	+ ddGTP + polimeraza DNA
GCAT A	GCAT AT	GCAT ATGTC	GCAT ATG
GCAT ATGTCA	GCAT ATGT	GCAT ATGTCAGTC	GCAT ATGTCAG
GCAT ATGTCAGTCCA	GCAT ATGTCAGT	GCAT ATGTCAGTCC	GCAT ATGTCAGTCCAG

A T C G

3' G A C C T G A C T G T A 5'

dCTP, dGTP, dTTP — *zielone* A, C, G i T). Jeśli w mieszaninie znajduje się ponadto dideoksyanalog jednego z tych nukleotydów, to także zostaje on wprowadzony do rosnącego łańcucha DNA. Taki łańcuch nie ma teraz grupy 3′ OH, wskutek czego nie jest możliwe przyłączenie do niego kolejnego nukleotydu i w tym *miejscu synteza łańcucha DNA zostaje* przerwana. W ilustrowanym przykładzie do mieszaniny normalnych dNTP dodano niewielką ilość dideoksyATP (ddATP — *czerwone A*). Współzawodniczy on z normalnym deoksyATP (dATP — *zielone A*), w wyniku czego od czasu do czasu przypadkowo do rosnącego łańcucha DNA zostaje wprowadzony dideoksyanalog. W mieszaninie reakcyjnej powstaje ostatecznie cały zestaw cząsteczek DNA o różnej długości, komplementarnych do DNA matrycowego i kończących się analogiem nukleotydu adenylowego w każdej z pozycji, w której ten nukleotyd powinien być wprowadzony. (C) Żeby określić kompletną sekwencję nukleotydową fragmentu DNA, dwuniciowy DNA rozdziela się najpierw na pojedyncze nici i jedna z tych nici jest wykorzystywana jako matryca do sekwencjonowania (kolor *szary*). Do każdej z czterech oddzielnie przeprowadzanych reakcji syntezy DNA dodaje się po jednym z czterech dideoksyanalogów normalnych substratów (dideoksyanalogi — kolor *czerwony*). W każdej z tych *czterech mieszanin reakcyjnych* uzyskuje się zestaw produktów komplementarnych do tej samej matrycy, ale w każdej z tych mieszanin produkty kończą się innym nukleotydem. Produkty czterech mieszanin rozdziela się równocześnie na żelu w czterech równoległych ścieżkach (oznaczonych tutaj A, T, C i G). Nowo zsyntetyzowane produkty wykrywa się na podstawie zawartego w nich znacznika (radioaktywnego albo fluoryzującego) wprowadzonego albo do startera, albo do jednego z trifosforanów deoksyrybonukleozydów stanowiących substraty do syntezy nici DNA. Pasma (prążki) w każdej ścieżce stanowią fragmenty, które uległy terminacji na określonym nukleotydzie (na przykład A w ścieżce pierwszej od lewej), ale zajmującym różne pozycje wzdłuż DNA. Odczytując kolejność pasm od dołu żelu z uwzględnieniem wszystkich czterech ścieżek ustalamy kolejność nukleotydów w DNA nowo zsyntetyzowanym. Sekwencję odczytaną w tym przykładzie przedstawiono na tle *zielonej strzałki* po prawej stronie żelu. Sekwencja ta jest taka sama jak sekwencja nici 5′–3′ (*kolor zielony*) wyjściowej dwuniciowej cząsteczki DNA



Rys. 10-6. Prezentacja kompletnej sekwencji nukleotydowej genomu *S. cerevisiae* (drożdży piekarniczych). (A) Genom jest rozmieszczony w 16 chromosomach, a jego sekwencję nukleotydową określono dzięki wspólnemu wysiłkowi naukowców pracujących w różnych miejscach świata, co zaznaczono kolorami (*szary* oznacza Kanadę, *pomarańczowy* — Unię Europejską — różne kraje europejskie, *żółty* — Zjednoczone Królestwo, *niebieski* — Japonię, *jasnozielony* — St. Louis, Missuri, *ciemnozielony* — Stanford, Kalifornia). Przewężenie obecne w każdym chromosomie stanowi położenie jego centromeru. Mały rejon chromosomu 11, zaznaczony kolorem *czerwonym*, przedstawiono w powiększeniu na rys. (B), w celu uwidocznienie dużego zagęszczenia genów, charakterystycznego dla tego gatunku. Niektóre geny są transkrybowane z dolnej nici DNA, inne z górnej. Cały genom o długości 12 147 813 par nukleotydów zawiera około 6200 genów

Określanie sekwencji nukleotydowej fragmentów DNA

W późnych latach siedemdziesiątych opracowano szybkie i proste metody, za pomocą których można określić sekwencję nukleotydową dowolnego fragmentu DNA. Opracowano kilka takich metod, ale najszerzej stosowana metoda polega na przygotowaniu za pomocą polimerazy DNA częściowych kopii tego DNA, którego sekwencję chcemy poznać. Stosowane przy tym reakcje przeprowadza się *in vitro* w warunkach zapewniających terminację (zakończenie) nowo syntetyzowanego łańcucha DNA po osiągnięciu określonego nukleotydu (A, G, C lub T) na nici stanowiącej matrycę (rys. 10-5A i B). Jak przedstawiono to na rys. 10-5C, metoda prowadzi do uzyskania kolekcji różnych kopii DNA, które ulegają terminacji w jednej z zadanych pozycji matrycowego DNA i w rezultacie długości poszczególnych kopii różnią się pojedynczym nukleotydem. Mieszaninę kopii rozdziela się według długości za pomocą elektroforezy żelowej, a kolejność ułożenia w żelu poszczególnych częściowych kopii określa sekwencję nukleotydową wyjściowego DNA, tak jak to pokazano na rysunku.

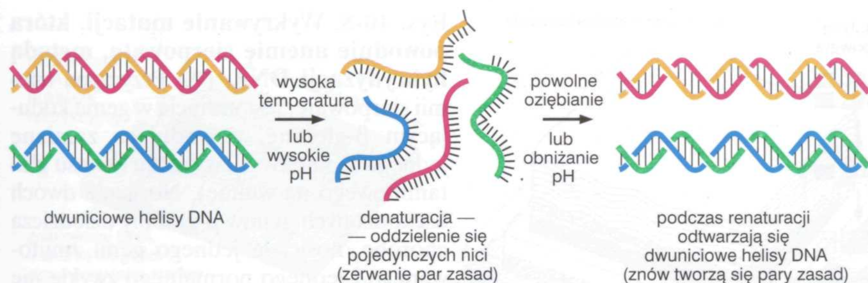
Obecnie znana jest już sekwencja nukleotydowa dziesiątków tysięcy genów, kilku całkowitych genomów bakterii oraz genomu prostego organizmu eukariotycznego — drożdży *S. cerevisiae* (rys. 10-6). Przed rokiem 2000 spodziewane jest zakończenie prac nad kompletną sekwencją DNA genomu muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) i nicienia *Caenorhabditis elegans*. Objętość informacji o sekwencjach DNA zawartej w komputerowych bazach danych jest obecnie tak wielka (setki milionów nukleotydów), że analiza i racjonalna organizacja tych informacji nie jest możliwa bez wysoce wyrafinowanych, specjalistycznych programów komputerowych.

Udoskonalanie technik sekwencjonowania DNA umożliwiło naukowcom podjęcie prac zmierzających do określenia sekwencji nukleotydów całego genomu człowieka. W sumie genom ten ma długość około $3 \cdot 10^9$ nukleotydów. Ponieważ sekwencje te dyktują syntezę wszystkich możliwych cząsteczek RNA i wszystkich białek, z których składa się ludzkie ciało, zakończenie projektu analizy całego genomu człowieka dostarczy swego rodzaju słownika istoty ludzkiej, co znakomicie przyspieszy przyszłe badania komórek i tkanek człowieka.

Pytanie 10-2. Jakie byłyby konsekwencje zwiększenia stosunku trifosforanów dideoksyrybonukleozydów do trifosforanów deoksyrybonukleozydów w mieszaninie reakcyjnej podczas sekwencjonowania DNA? Co nastąpi wskutek zmniejszenia tej proporcji?

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych

Po wyizolowaniu jakiegoś całego genu w postaci odcinka DNA chcielibyśmy wiedzieć, z jakiego chromosomu ten gen pochodzi i gdzie jest on zlo-



Rys. 10-7. Denaturacja i renaturacja (hybrydyzacja) DNA. Aby mogła zajść hybrydyzacja, dwie pojedyncze nici muszą mieć komplementarne sekwencje nukleotydowe, umożliwiające tworzenie się par zasad. W podanym przykładzie wzajemnie komplementarne są nici czerwona z *pomarańczową* oraz *niebieska z zieloną*

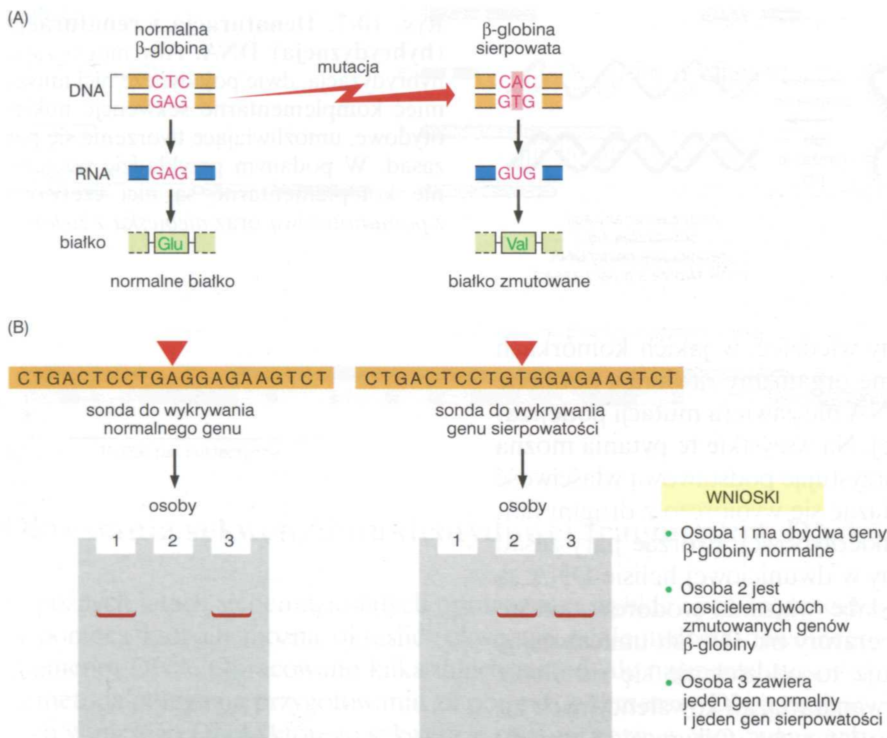
kalizowany w chromosomie. Chcielibyśmy wiedzieć, w jakich komórkach organizmu gen ulega transkrypcji i czy inne organizmy zawierają podobne geny, lub zbadać, czy próbka ludzkiego DNA nie zawiera mutacji podejrzanych o powodowanie choroby dziedzicznej. Na wszystkie te pytania można uzyskać odpowiedź w laboratorium, wykorzystując podstawową właściwość DNA: jeden łańcuch (nić) DNA może wiązać się wybiórczo z drugim łańcuchem o *komplementarnej* sekwencji nukleotydowej, tworząc pary zasad opisane przez Watsona i Cricka. Łańcuchy w dwuniciowej helisie DNA są utrzymywane razem przez stosunkowo słabe wiązania wodorowe, które można zerwać ogrzewając DNA do temperatury ok. 90° lub umieszczając go w warunkach skrajnego pH. Powoduje to oddzielenie się od siebie dwóch nici DNA, ale nie prowadzi do zerwania wiązań kowalencyjnych łączących poszczególne nukleotydy każdego łańcucha. Odwracając pomału ten proces (to znaczy powoli obniżając temperaturę do temperatury pokojowej lub zobojętniając roztwór), możemy doprowadzić do odtworzenia się dwuniciowej helisy z pojedynczych nici komplementarnych. Proces taki jest nazywany *renaturacją* lub **hybrydyzacją**, a jego wynikiem jest odtworzenie się poprzednio zerwanych wiązań wodorowych (rys. 10-7).

Podobna reakcja hybrydyzacji nastąpi między dowolnymi pojedynczymi łańcuchami kwasów nukleinowych (DNA/DNA, RNA/RNA lub RNA/DNA), pod warunkiem, że zawierają one komplementarne sekwencje nukleotydów. Zdolność jednoniciowej cząsteczki kwasu nukleinowego do tworzenia dwuniciowej helisy tylko z cząsteczką komplementarną stanowi podstawę dokładnej i bardzo ważnej techniki wykrywania określonych sekwencji nukleotydowych zarówno w DNA jak i RNA.

Hybrydyzacja DNA ułatwia prenatalne diagnozowanie chorób genetycznych

Aby wyszukać określoną sekwencję nukleotydową wśród innych sekwencji, należy najpierw przygotować kwas nukleinowy zwany sondą, za pomocą którego dokonamy tych poszukiwań. *Sondą DNA* może być krótki jednoniciowy *oligonukleotyd* DNA, zwykle o długości 10–1000 nukleotydów. Sondę stosuje się w reakcji hybrydyzacji do wykrycia cząsteczek kwasów nukleinowych, zawierających sekwencje nukleotydowe komplementarne do sekwencji sondy. Początkowo badacze musieli się ograniczyć do sond otrzymywanych ze źródeł naturalnych. Obecnie, dzięki postępom chemii kwasów nukleinowych, w laboratorium można syntetyzować metodami nieenzymatycznymi krótkie odcinki DNA o dowolnie programowanej sekwencji. Odpowiednie urządzenie (o wymiarach kuchenki mikrofalowej) można zaprogramować tak, by łączyło nukleotydy w drodze *syntezy chemicznej*, tworząc łańcuchy jednoniciowego DNA o dowolnej sekwencji i długości do ok. 120 nukleotydów.

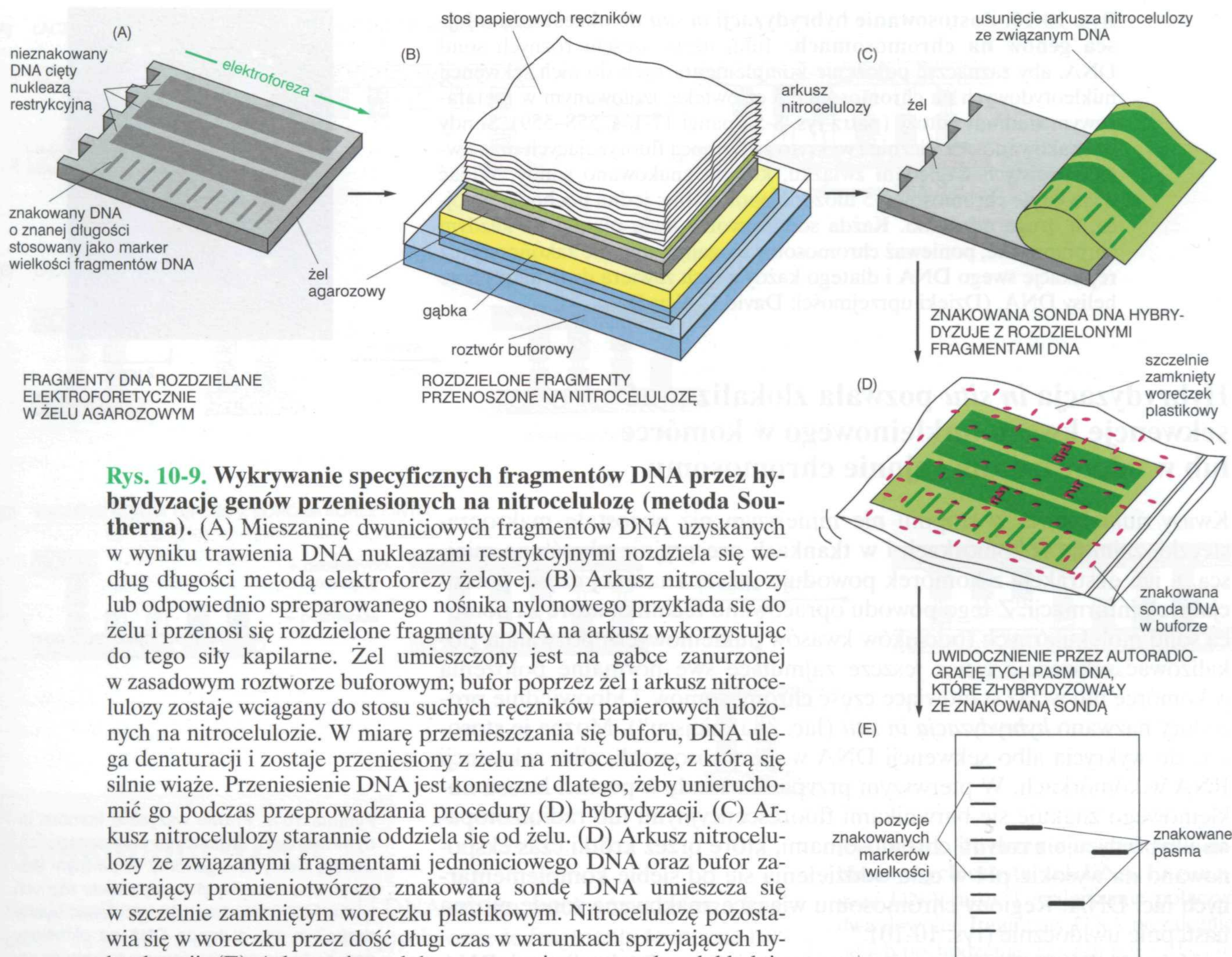
Jeden ze sposobów wykorzystania sond DNA i hybrydyzacji do wykrycia ewentualnych nosicieli chorób genetycznych ilustruje następujący



Rys. 10-8. Wykrywanie mutacji, która powoduje anemię sierpowatą, metodą hybrydyzacji DNA. (A) Przyczyną anemii sierpowatej jest mutacja w genie kodującym β-globinę, powodująca zamianę jednego aminokwasu w białku (kwasu glutaminowego na walinę). Nosiciele dwóch uszkodzonych genów β-globiny dziedziczą chorobę, nosiciele jednego genu zmutowanego i jednego normalnego zwykle nie wykazują objawów choroby. (B) Zmutowany gen można wykryć w DNA zarodka drogą hybrydyzacji DNA. Próbki DNA zarodka traktuje się najpierw nukleazami restrykcyjnymi i uzyskane fragmenty (łącznie z tymi, które zawierają część genu β-globiny) poddaje elektroforezie w żelu. Następnie żel traktuje się sondą DNA, wykrywającą tylko te fragmenty restrykcyjne, które zawierają gen β-globiny. Stosuje się dwa rodzaje syntetycznych oligonukleotydów, z których jeden odpowiada sekwencji genu normalnego, drugi — sekwencji genu zmutowanego. Sondy są znakowane albo markerami radioaktywnymi, albo barwnikami fluoryzującymi wprowadzanymi do nich podczas ich syntezy (patrz też rys. 10-9)

przykład. Wynikiem mutacji w pojedynczych genach jest ponad 3000 różnego rodzaju chorób genetycznych. W większości przypadków mutacje te są *recesywne* — tzn. ujawniają się tylko wtedy, gdy osobnik dziedziczy dwie jednakowo uszkodzone kopie genu, po jednej od każdego z rodziców. W przypadku niektórych spośród tych chorób można we wczesnym okresie rozwoju zarodka stwierdzić, czy zawiera on dwie kopie uszkodzonego genu; informacja tego rodzaju może być jednym z czynników w podejmowaniu decyzji o ewentualnym przerwaniu ciąży.

Badanie jednego tylko genu w genomie człowieka wymaga poszukiwania go wśród ponad trzech miliardów nukleotydów. Jednak niewiarygodna wprost specyficzność hybrydyzacji umożliwia zrealizowanie takiego zadania. Na przykład dokładnie znana jest sekwencja recesywnego zmutowanego genu powodującego anemię sierpowatą: na nici kodującej normalnego genu β-globiny sekwencja GAG jest w pewnym miejscu zastąpiona przez sekwencję GTG (rys. 10-8A). Powoduje to zmianę kodowanego aminokwasu z kwasu glutaminowego na walinę. Ta niewielka zmiana wystarczy jednak, by zmienić właściwości cząsteczki hemoglobiny i powodować chorobę (patrz rys. 6-23). W celu prenatalnego diagnozowania anemii sierpowatej, z komórek zarodka należy wyekstrahować DNA. Następnie do badania tego DNA stosuje się dwie sondy molekularne: jedną — komplementarną do sekwencji odpowiedniego rejonu w normalnym genie i drugą — odpowiadająca temu rejonowi w genie zmutowanym. Jeśli sondy są krótkie (ok. 20 nukleotydów), hybrydyzuje się je z DNA w temperaturze, w której stabilne są helisy tylko całkowicie komplementarnych odcinków DNA. Za pomocą tej techniki można stwierdzić, ile defektywnych kopii genu β-globiny zawiera DNA izolowany z zarodka: jedną, dwie, czy nie zawiera żadnej (rys. 10-8B). Można rozpoznać, czy na przykład zarodek zawiera obydwie kopie genu zmutowane (co spowoduje wystąpienie choroby), gdyż jego DNA będzie wówczas hybrydyzował tylko z tą sondą, która jest komplementarna do rejonu zawierającego

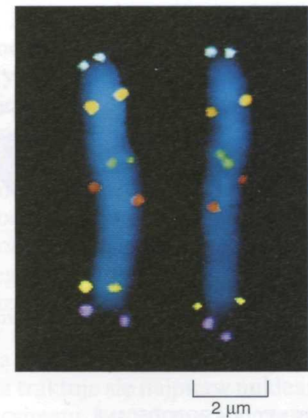


Rys. 10-9. Wykrywanie specyficznych fragmentów DNA przez hybrydyzację genów przeniesionych na nitrocelulozę (metoda Southerna). (A) Mieszaninę dwuniciowych fragmentów DNA uzyskanych w wyniku trawienia DNA nukleazami restrykcyjnymi rozdziela się według długości metodą elektroforezy żelowej. (B) Arkusz nitrocelulozy lub odpowiednio spreparowanego nośnika nylonowego przykłada się do żelu i przenosi się rozdzielone fragmenty DNA na arkusz wykorzystując do tego siły kapilarne. Żel umieszczony jest na gąbce zanurzonej w zasadowym roztworze buforowym; bufor poprzez żel i arkusz nitrocelulozy zostaje wciągany do stosu suchych ręczników papierowych ułożonych na nitrocelulozie. W miarę przemieszczania się buforu, DNA ulega denaturacji i zostaje przeniesiony z żelu na nitrocelulozę, z którą się silnie wiąże. Przeniesienie DNA jest konieczne dlatego, żeby unieruchomić go podczas przeprowadzania procedury (D) hybrydyzacji. (C) Arkusz nitrocelulozy starannie oddziela się od żelu. (D) Arkusz nitrocelulozy ze związanymi fragmentami jednoniciowego DNA oraz bufor zawierający promieniotwórczo znakowaną sondę DNA umieszcza się w szczelnie zamkniętym woreczku plastikowym. Nitrocelulozę pozostawia się w woreczku przez dość długi czas w warunkach sprzyjających hybrydyzacji. (E) Arkusz nitrocelulozy usuwa się z woreczka, dokładnie płucze, tak by pozostały tylko te cząsteczki sondy, które utworzyły hybrydy z DNA związanym na nitrocelulozie. Po autoradiografii uwidocznione zostają tylko te pasma DNA, które utworzyły hybrydy ze znakowaną sondą. Podobną technikę, określaną jako *metoda Northern*, stosuje się do wykrywania specyficznych sekwencji RNA. W metodzie Northern elektroforezie w żelu poddaje się cząsteczki mRNA, a jako sondy zwykle stosuje się jednoniciowe cząsteczki DNA

mutację. Procedurę laboratoryjną, za pomocą której można wykryć sekwencje komplementarne do stosowanej sondy, zwaną *hybrydyzacją Southerna*, przedstawiono na rys. 10-9.

Tę samą technikę można zastosować do wykrycia podatności danej osoby na wystąpienie jakiejś choroby. Na przykład można ją zastosować do ewentualnego wykrycia, czy jakaś osoba odziedziczyła nienormalne kopie genów warunkujących usuwanie błędnych par zasad w DNA. U takich osób nie jest możliwe skuteczne usuwanie błędów mogących powstawać podczas replikacji DNA. Wówczas (szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych jedna osoba na 200 jest obciążona tą wadą) istnieje znacznie zwiększone ryzyko wystąpienia raka, szczególnie niektórych typów raka okrężnicy (patrz rozdz. 6). Dla zapewnienia perspektyw długiego zdrowia, osoby te powinny podjąć odpowiednie kroki zapobiegawcze, a szczególnie powinny często poddawać się kontroli lekarskiej.

Pytanie 10-3. Określenie sekwencji nukleotydowej twoich własnych dwóch genów β-globiny (po jednym z każdego z dwóch twoich chromosomów 11) ujawniło mutację w jednym z tych genów. Jak dalece — na podstawie tylko tej informacji — powinieneś się obawiać, że jesteś nosicielem dziedzicznej choroby, którą możesz przekazać swoim dzieciom? Jakie inne informacje powinieneś uzyskać, aby dokładniej ocenić ryzyko?



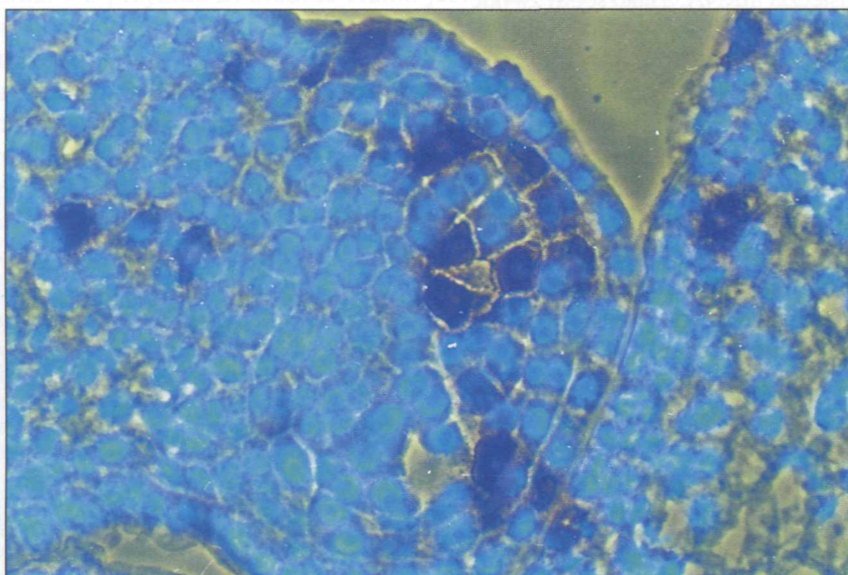
Rys. 10-10. Zastosowanie hybrydyzacji *in situ* do określania miejsca genów na chromosomach. Tutaj użyto sześciu różnych sond DNA, aby zaznaczyć położenie komplementarnych do nich sekwencji nukleotydowych na chromosomie 5 człowieka, izolowanym w metafazowym stadium mitozy (patrz rys. 8-5 i panel 17-1, s. 558–559). Sondy wyznakowano chemicznie i wykryto za pomocą fluoryzujących przeciwciał swoistych względem związku, którym znakowano sondy. Widać dwie kopie chromosomu 5 ułożone obok siebie: jedna pochodzi od ojca, a druga od matki. Każda sonda tworzy dwie plamki na każdym chromosomie, ponieważ chromosomy ulegające mitozie zakończyły już replikację swego DNA i dlatego każdy z nich zawiera dwie identyczne helisy DNA. (Dzięki uprzejmości: David C. Ward)

Hybrydyzacja *in situ* pozwala zlokalizować sekwencję kwasu nukleinowego w komórce lub w odpowiednim rejonie chromosomu

Kwasy nukleinowe, w stopniu nie mniejszym niż pozostałe makrocząsteczki, zajmują w komórkach i w tkankach precyzyjnie określone miejsca, a ich ekstrakcja z komórek powoduje utratę znacznej części potencjalnych informacji. Z tego powodu opracowano techniki, które za pomocą sond molekularnych (odcinków kwasów nukleinowych) pozwalają zlokalizować sekwencje wciąż jeszcze zajmujące swe normalne położenia w komórce lub wciąż stanowiące część chromosomów. Odpowiednie procedury nazwano *hybrydyzacją in situ* (łac. „na miejscu"). Można je stosować do wykrycia albo sekwencji DNA w chromosomach, albo sekwencji RNA w komórkach. W pierwszym przypadku sondy w postaci kwasu nukleinowego znakuje się barwnikami fluorescencyjnymi lub radioizotopami i hybrydyzuje z całymi chromosomami, które przez krótki czas eksponowano na wysokie pH w celu oddzielenia się od siebie komplementarnych nici DNA. Regiony chromosomu wiążące znakowaną sondę można następnie uwidocznić (rys. 10-10).

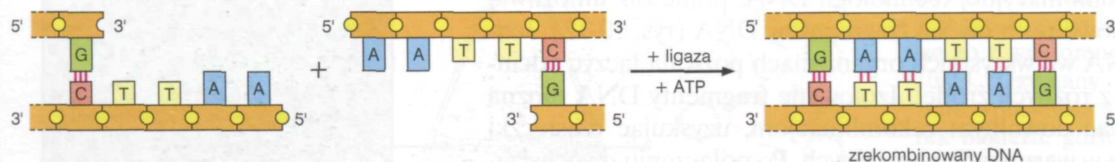
Hybrydyzacja *in situ* może też ujawnić rozmieszczenie określonych RNA w komórkach różnych tkanek (rys. 10-11). Technika ta przyczyniła się szczególnie do zrozumienia rozwoju embrionalnego poprzez uwidocznienie wielu zmian obrazu ekspresji genów w różnych komórkach zarodka.

Pytanie 10-4. Prawie wszystkie komórki indywidualnego organizmu zwierzęcego zawierają identyczne genomy. W pewnym eksperymencie tkankę złożoną z wielu różnych typów komórek utrwalono i poddano hybrydyzacji *in situ* z sondą DNA na określony gen. Ku twojemu zdziwieniu w niektórych komórkach sygnał hybrydyzacji był znacznie silniejszy niż w pozostałych. Wyjaśnij ten rezultat.

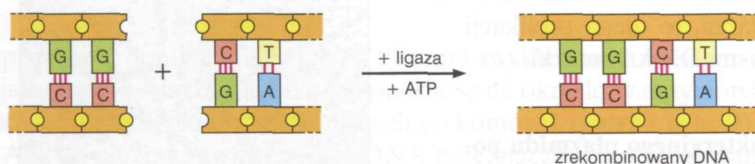


Rys. 10-11. Hybrydyzacja *in situ* umożliwia wizualizację komórek, w których dochodzi do syntezy określonego rodzaju mRNA. Przykład ten pokazuje grupę komórek wierzchołka rosnącego pędu wyżlinu (lwiej paszczy). Tylko w niektórych z nich (wybarwionych *ciemnoniebiesko*) dochodzi do ekspresji mRNA cyklin – białek wyzwalających podziały komórek. Komórki traktowano sondą DNA specyficznie wykrywającą mRNA cyklin. Sondę połączono z enzymem, który katalizuje powstanie ciemnoniebieskiego produkt reakcji. Jądra innych komórek są *jasnoniebieskie*, ponieważ DNA w nich zawarty wybarwiono barwnikiem DAPI. (Dzięki uprzejmości: John Doonan)

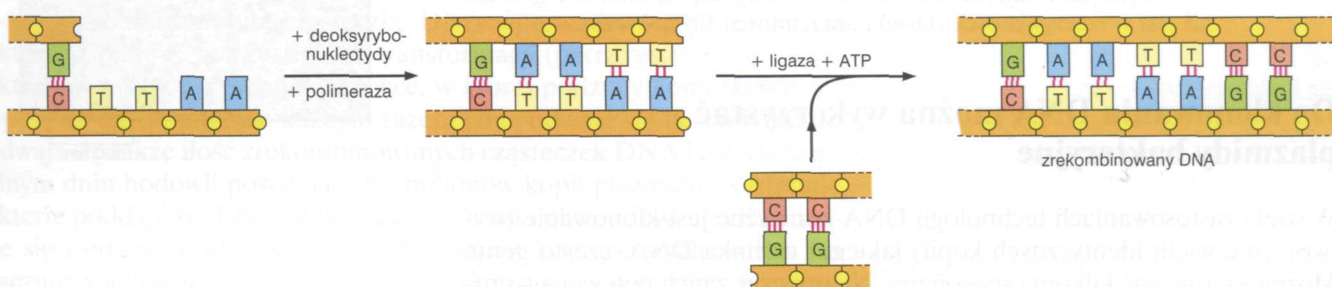
(A) ŁĄCZENIE DWÓCH KOMPLEMENTARNYCH KOŃCÓW KOHEZYJNYCH



(B) ŁĄCZENIE DWÓCH KOŃCÓW TĘPYCH



(C) ŁĄCZENIE KOŃCA TĘPEGO Z KOŃCEM KOHEZYJNYM



Rys. 10-12. Tworzenie *in vitro* zrekombinowanych cząsteczek DNA. Enzym ligaza DNA może kowalencyjnie połączyć dwa dowolne fragmenty DNA niezależnie od ich pochodzenia. Energii potrzebnej ligazie DNA do odtworzenia ciągłości rdzenia cukrowo-fosforanowego w DNA dostarcza ATP. (A) Łączenie dwóch fragmentów DNA otrzymanych w wyniku trawienia nukleazą restrykcyjną Eco RI. Należy zauważyć, że kohezyjne („lepkie") końce tworzone przez ten enzym umożliwiają asocjację fragmentów DNA dzięki tworzeniu się poprawnych par zasad między łańcuchami na ich zakończeniach, co znacznie ułatwia łączenie takich fragmentów. Reakcja ligacji odtwarza też wyjściowe miejsce restrykcyjne w cząsteczce DNA. (B) Łączenie fragmentu otrzymanego po trawieniu DNA restryktazą Hae III z fragmentem uzyskanym za pomocą Alu I. (C) Łączenie fragmentów DNA wytworzonych przez Eco RI z fragmentami uzyskanymi za pomocą Hae III. Lukę nukleotydową we fragmentach po Eco RI (cięcie ukośne, końce kohezyjne) uzupełnia się nukleotydami używając polimerazy DNA. Każdy z fragmentów DNA pokazanych na rysunku jest tak zorientowany, że ich końce 5′ znajdują się po lewej stronie łańcucha górnego i po prawej stronie łańcucha dolnego, tak jak to zaznaczono w części (A)

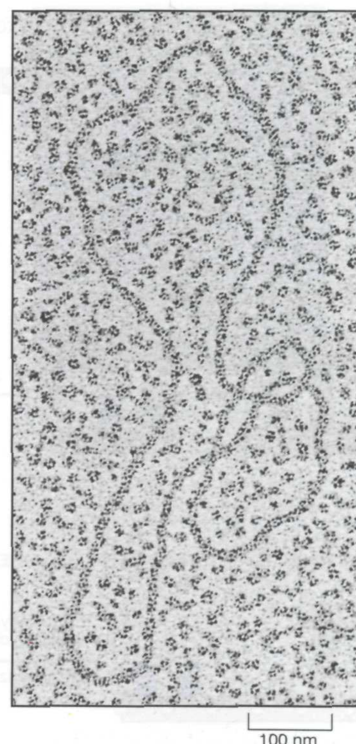
Klonowanie DNA

Przekonaliśmy się już, że cząsteczki DNA można rozcinać na krótsze fragmenty za pomocą nukleaz restrykcyjnych, oraz że fragmenty te można rozdzielić stosując elektroforezę żelową. Omówiliśmy też, w jaki sposób można określić sekwencję nukleotydową fragmentu DNA i jak wykorzystać sondy o określonej sekwencji do wyszukania hybrydyzujących z nimi fragmentów DNA komplementarnych do stosowanych sond. W tej części rozdziału przedstawimy, jak można połączyć te techniki w celu klonowania poszczególnego odcinka DNA. W biologii molekularnej termin **klonowanie DNA** stosuje się w dwóch znaczeniach. W jednym dosłownie oznacza proces tworzenia wielu identycznych kopii jakiejś cząsteczki DNA; w drugim znaczeniu — izolowanie szczególnego odcinka DNA (często określonego genu) i oddzielenie go od reszty komórkowego DNA, ponieważ ten proces jest ułatwiony właśnie przez tworzenie wielu identycznych kopii odcinka DNA stanowiącego obiekt naszego zainteresowania.

Ligaza DNA łącząc fragmenty DNA tworzy cząsteczkę zrekombinowanego DNA

Współczesna technologia DNA zależy zarówno od możliwości rozcinania długich cząsteczek DNA na fragmenty o wygodnej długości, jak i od możliwości ponownego łączenia tych fragmentów w nowych kombinacjach. Podobnie jak większości technologicznych udoskonaleń omawianych w tym rozdziale, komórki same dostarczyły rozwiązania tego problemu. W rozdziale 6 wskazano, że enzym **ligaza DNA** jest w każdej komórce potrzebna do łączenia fragmentów DNA podczas replikacji DNA lub podczas jego

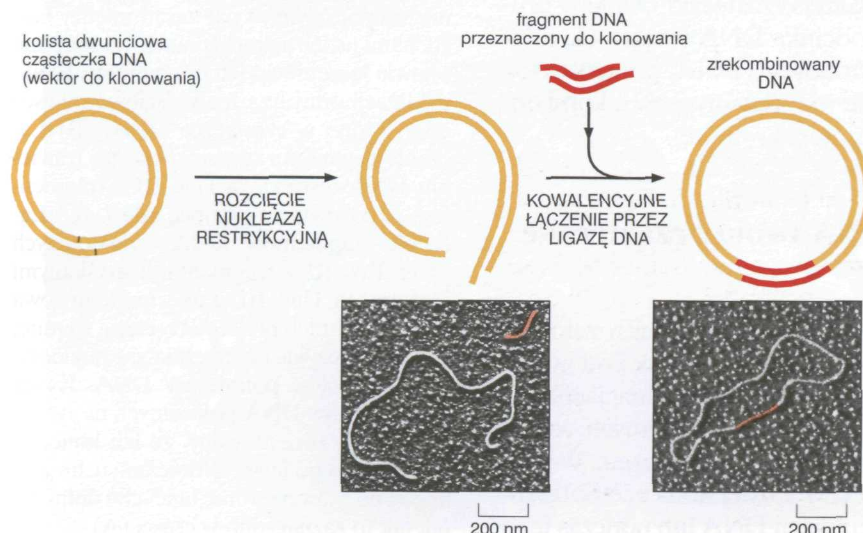
naprawy (patrz rys. 6-20 i 6-30). Enzym ten stał się jednym z najważniejszych narzędzi w rekombinacyjnej technologii DNA, ponieważ umożliwia on łączenie ze sobą dowolnych dwóch fragmentów DNA (rys. 10-12). Jednakowa struktura DNA we wszystkich organizmach pozwala łączyć odcinki DNA pochodzące z różnych źródeł. Izolowane fragmenty DNA można w probówce poddawać dowolnym rekombinacjom, uzyskując cząsteczki DNA nie występujące w warunkach naturalnych. Po połączeniu dwóch cząsteczek DNA przez ligazę, komórka nie potrafi ocenić, czy początkowo występowały one oddzielnie, i traktuje utworzony w ten sposób związek jako pojedynczą cząsteczkę DNA. Jeśli taki obcy odcinek DNA zostanie odpowiednio wprowadzony do DNA komórki gospodarza, to ulega replikacji i transkrypcji w taki sam sposób, jak normalny własny DNA komórki.



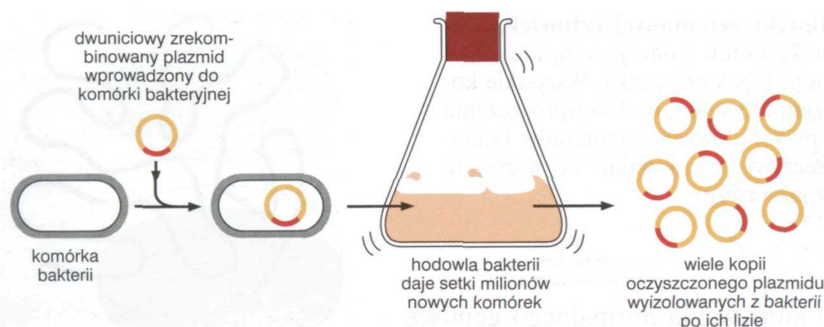
Rys. 10-13. Mikrografia elektronowa bakteryjnego plazmidu powszechnie stosowanego jako wektor do klonowania. Ta kolista cząsteczka dwuniciowego DNA składa sie z kilku tysięcy par nukleotydów. Wybarwianie niezbędne do uwidocznienia DNA w mikroskopie elektronowym powoduje, że cząsteczka DNA wydaje się znacznie grubsza niż jest w rzeczywistości. (Dzięki uprzejmości: Brian Wells)

Do klonowania DNA można wykorzystać plazmidy bakteryjne

W wielu zastosowaniach technologii DNA konieczne jest klonowanie (wytworzenie wielu identycznych kopii) jakiegoś odcinka DNA, często genu. Można to osiągnąć kilkoma sposobami. Najprostszy z nich polega na wprowadzeniu DNA, który ma być powielony, do szybko dzielących się komórek bakteryjnych. Każdorazowo, gdy komórka replikuje swój własny DNA, kopiuje także DNA do niej wprowadzony. Aby utrzymać obcy DNA w komórce bakteryjnej, jako jego nośniki, czyli *wektory*, stosuje się albo bakteryjne plazmidy, albo genomy bakteriofagów. Typowy wektor **plazmidowy** używany do klonowania jest stosunkowo małą kolistą cząsteczką DNA o długości kilku tysięcy par nukleotydów, mogącą ulegać replikacji w komórce bakteryjnej (rys. 10-13). Wektor plazmidowy musi zawierać miejsce początku replikacji, które umożliwia jego replikację w komórce niezależną od replikacji chromosomu bakteryjnego. Musi też zawierać miejsce rozcinane przez nukleazę restrykcyjną, tak by można było otworzyć plazmid



Rys. 10-14. Insercja fragmentu DNA do plazmidu bakteryjnego z użyciem ligazy DNA. Plazmid rozcina się w jednym miejscu nukleazą restrykcyjną (w tym przypadku tworzącą kohezyjne końce) i miesza się z fragmentem DNA przeznaczonym do klonowania (który przygotowano używając tego samego enzymu restrykcyjnego), ligazą DNA i ATP. Kohezyjne końce tworzą pary zasad, a ligaza DNA łączy łańcuchy, tworząc kompletną zrekombinowaną cząsteczkę DNA. (Mikrografie dzięki uprzejmości: Huntington Potter, David Dressler)



Rys. 10-15. Klonowanie fragmentu DNA. W celu uzyskania wielu kopii określonego fragmentu DNA najpierw łączy się go z wektorem, jak pokazano na rys. 10-14. Uzyskany zrekombinowany plazmid wprowadza się następnie do komórek bakterii, gdzie może się replikować wiele milionów razy w miarę mnożenia się bakterii

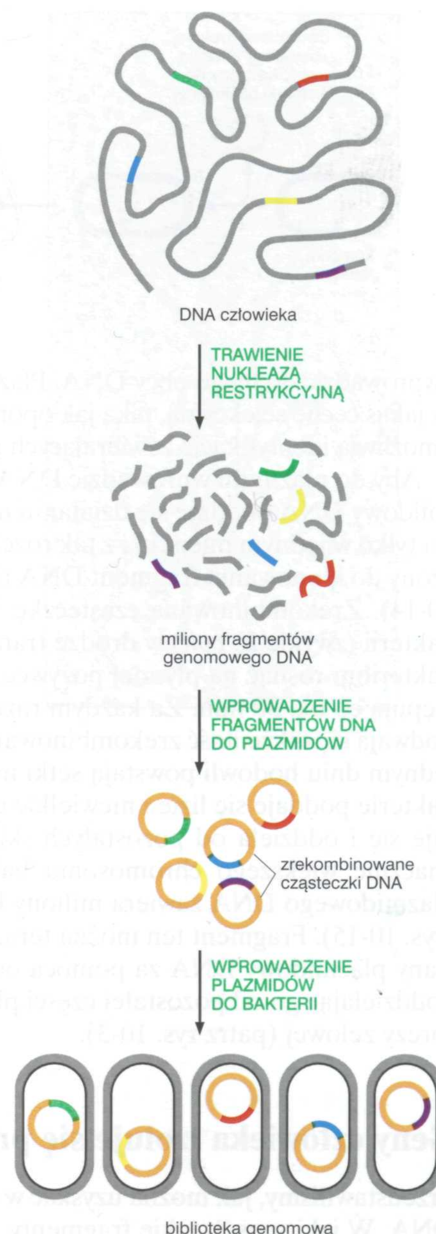
i wprowadzić do niego obcy DNA. Plazmid zwykle zawiera też gen kodujący jakąś cechę selekcyjną, taką jak oporność na określony antybiotyk, która umożliwia identyfikację zawierających go komórek (patrz rozdz. 9).

Aby do plazmidu wprowadzić DNA przeznaczony do klonowania, plazmidowy DNA poddaje się działaniu nukleazy restrykcyjnej, która go zrywa tylko w jednym miejscu, i z tak rozciętym plazmidem łączy się przeznaczony do klonowania fragment DNA (insert) za pomocą ligazy DNA (rys. 10-14). Zrekombinowaną cząsteczkę DNA wprowadza się następnie do bakterii (zwykle *E. coli*) w drodze transformacji (patrz rys. 9-8) i pozwala bakteriom rosnąć na płynnej pożywce, w której podziały komórkowe następują co ok. 30 min. Za każdym razem gdy podwaja się liczba bakterii, podwaja się także ilość zrekombinowanych cząsteczek DNA i zaledwie po jednym dniu hodowli powstają setki milionów kopii plazmidu. Następnie bakterie poddaje się lizie i niewielkie cząsteczki plazmidowego DNA izoluje się i oddziela od pozostałych składników komórkowych, w tym od znacznie większego chromosomu bakteryjnego. Oczyszczony preparat plazmidowego DNA zawiera miliony kopii wyjściowego fragmentu DNA (rys. 10-15). Fragment ten można teraz odzyskać, rozcinając zrekombinowany plazmidowy DNA za pomocą odpowiedniej nukleazy restrykcyjnej i oddzielając go od pozostałej części plazmidu (wektora) metodą elektroforezy żelowej (patrz rys. 10-3).

Geny człowieka izoluje się przez klonowanie

Przedstawiliśmy, jak można uzyskać w dużych ilościach dowolny fragment DNA. W jaki sposób takie fragmenty można identyfikować? W szczególności, jak po raz pierwszy wyizolować pojedynczy gen (spośród ok. 60 000 innych genów w genomie człowieka) w drodze klonowania? Jako przykład postępowania przedstawimy etapy klonowania genu kodującego *czynnik VIII* krzepliwości krwi. Chociaż szczegółowe sposoby izolowania i klonowania ludzkich genów różnią się zależnie od przypadku, wybrany przykład ilustruje ogólną ich strategię.

Uszkodzenia genu czynnika VIII krzepliwości krwi są powodem najczęściej występującego typu *hemofilii*, jakim jest hemofilia A. Tę genetycznie uwarunkowaną chorobę rozpoznano już ponad 1000 lat temu, a jej skutki obserwuje się u 1 na 10000 mężczyzn. Chorzy na hemofilię A są niezdolni do wytwarzania w pełni aktywnego czynnika VIII i z tego powodu występują u nich okresowe niekontrolowane krwawienia. Do niedawna leczenie tej choroby polegało na podawaniu w formie iniekcji stężonego roztworu białkowego czynnika VIII, co wymagało łączenia porcji krwi uzyskanych od wielu dawców. Leczenie tego rodzaju wystawiało osoby cierpiące na hemofilię na ryzyko zakażenia wirusami, w tym wirusem HIV (wywołującym AIDS). Opłacalna produkcja czystego czynnika VIII oparta na rekombinacyjnej technologii DNA stanowi istotny postęp w lecze-



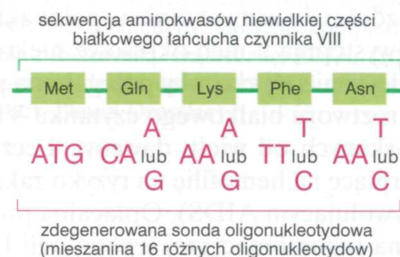
Rys. 10-16. Konstruowanie biblioteki genomowej człowieka. Bibliotekę genomową stanowi zestaw komórek bakteryjnych, z których każda zawiera inny niewielki fragment DNA człowieka. Wszystkie komórki powinny zawierać w sumie kompletny genom. Dla uproszczenia pokazano klonowanie tylko kilku przykładowych fragmentów (zanaczonych różnymi *kolorami*). W rzeczywistości klonuje się wszystkie fragmenty DNA (także zaznaczone jako *szare*)

niu schorzenia. Osiągnięcie to wymagało klonowania normalnego genu ludzkiego czynnika VIII oraz scalenia jego sekwencji kodujących. Sekwencję kodującą następnie wykorzystano do produkcji dużych ilości tego białka w sposób opisany w dalszej części tego rozdziału.

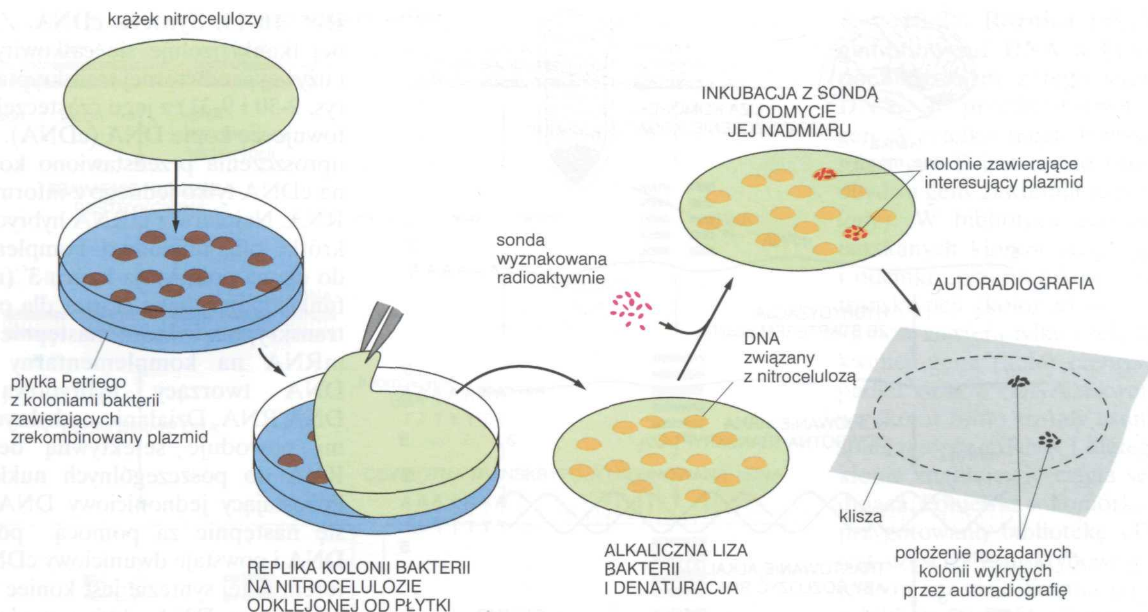
Pierwszym etapem klonowania jakiegoś genu człowieka jest rozbicie całkowitego DNA genomowego na mniejsze fragmenty, łatwiejsze w obróbce, gdyż bezpośrednie manipulowanie trzema miliardami par nukleotydów kompletnego genomu mogłoby być zadaniem zbyt zniechęcającym. Aby to osiągnąć, całkowity DNA izolowany z próbki jakiejś tkanki lub z kultury komórek człowieka rozcina się na mniejsze fragmenty DNA albo mechanicznie (wykorzystując tarcie), albo za pomocą nukleaz restrykcyjnych. Uzyskane fragmenty są następnie klonowane w sposób poprzednio opisany. Otrzymana kolekcja klonowanych fragmentów DNA nazywa się **biblioteką DNA**. W tym przypadku jest to *biblioteka genomowa*, gdyż fragmenty DNA pochodzą bezpośrednio z chromosomowego DNA. Jak zobaczymy to później, istnieją też innego rodzaju biblioteki DNA. Obecnie dysponujemy bibliotekami genomowymi wielu różnych organizmów, łatwo dostępnymi w celach badawczych. Eliminuje to potrzebę każdorazowego pracochłonnego konstruowania nowej biblioteki na początku izolowania jakiegoś genu.

Jeden z ogólnych sposobów przygotowania biblioteki genomowej człowieka przedstawiono na rys. 10-16. DNA człowieka najpierw rozcina się nukleazą restrykcyjną, co pozwala uzyskać miliony różnych fragmentów DNA. Wprowadza się je następnie do wektorów plazmidowych w warunkach sprzyjających umieszczeniu tylko jednego fragmentu DNA w każdej cząsteczce plazmidu. Zrekombinowane plazmidy miesza się z kulturą *E. coli* w takiej proporcji stężeń, która zapewnia wprowadzenie do jednej komórki bakteryjnej nie więcej niż jednej cząsteczki plazmidu. Uzyskana w ten sposób kultura bakteryjna stanowi bibliotekę genomową. Jeśli z płytki Petriego wyizoluje się kolonie pochodzące z pojedynczych komórek bakteryjnych (jak przedstawiono na rys. 9-2), to każda kolonia zawiera jeden poszczególny odcinek DNA człowieka. Kolekcja kilku milionów takich kolonii przedstawia cały genom człowieka.

Znalezienie określonego genu w bibliotece genomowej stwarza podobne problemy jak wyszukanie książki w prawdziwej bibliotece liczącej miliony tomów, w której jednak nie ma katalogu. Jak wyszukać określony



Rys. 10-17. Oligonukleotydowa sonda do wykrywania genu, oparta na znajomości odcinka sekwencji aminokwasowej białka. Ponieważ kod genetyczny jest zdegenerowany (to znaczy, że każdy aminokwas może być kodowany przez więcej niż jeden kodon, patrz rys. 7-20), każdej sekwencji aminokwasów może odpowiadać pewna ilość rozmaitych sekwencji nukleotydowych. Tylko jedna z tych sekwencji, zawarta w genomowym DNA, koduje białko, jednak nie można z góry przewidzieć, która. Dlatego do przeszukiwania biblioteki stosuje sie zdegenerowaną sondę oligonukleotydową, to znaczy mieszaninę wszystkich możliwych sekwencji. Pokazany przykład dotyczy ludzkiego czynnika VIII, a przedstawioną zdegenerowaną sondę rzeczywiście zastosowano podczas pierwszego klonowania tego genu w 1984 r.



odcinek DNA (w naszym przypadku gen czynnika VIII) w tej obszernej bibliotece ludzkiego DNA? Kluczem do tego jest poprzednio opisana hybrydyzacja kwasów nukleinowych. Jeśli dysponujemy sondą DNA komplementarną do genu czynnika VIII, to możemy ją wykorzystać do wyszukania odpowiedniego klonu w bibliotece. Tylko skąd wziąć taką sondę zanim poznamy sekwencję szukanego genu?

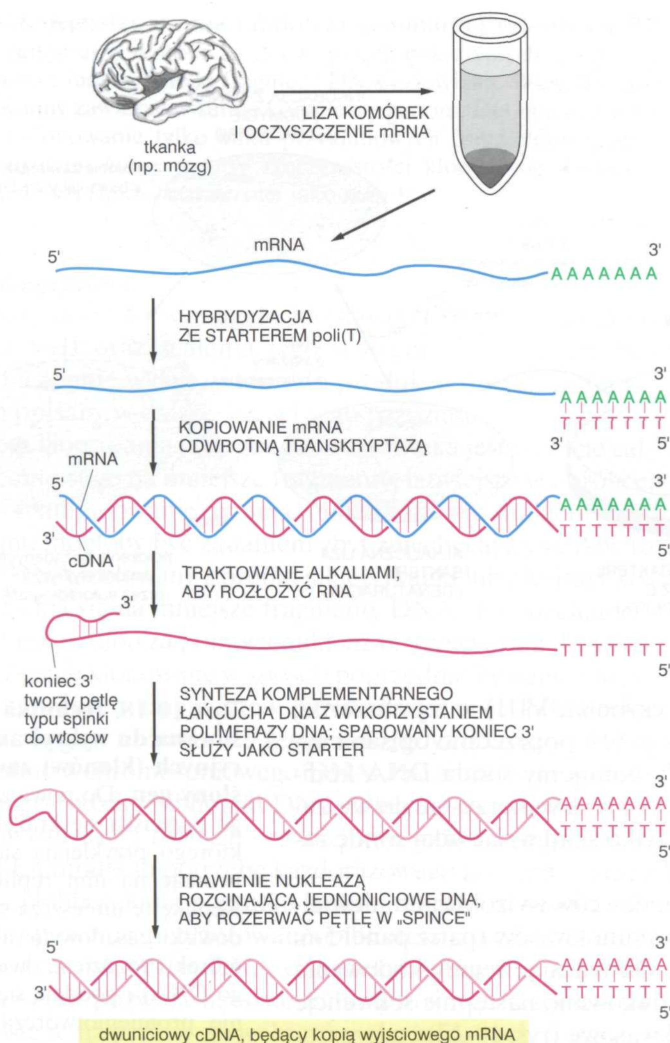
W przypadku czynnika VIII z krwi krwiodawców wyizolowano niewielką ilość tego białka i oznaczono sekwencję aminokwasów (patrz panel 5-6, s. 164–165) kilku jego krótkich odcinków. Odwracając reguły kodowania obowiązujące w kodzie genetycznym wydedukowano następnie sekwencje DNA kodujące poznane sekwencje aminokwasowe (rys. 10-17) i przygotowano odpowiednie sondy za pomocą chemicznych metod syntezy DNA. Używając takiej sondy można było metodą hybrydyzacji zidentyfikować nieliczne kolonie bakteryjne zawierające ludzki DNA komplementarny do sondy (rys. 10-18).

Stosując sondę na czynnik VIII w bibliotece genomowej zidentyfikowano pojedynczy klon zawierający DNA komplementarny do tej sondy. Sekwencjonowanie DNA zawartego w tym klonie wykazało jednak, że jest to tylko mała część genu czynnika VIII. Kolejne analizy umożliwiły złożenie całego genu z podobnie krótkich odcinków i wykazały, że cały gen czynnika VIII ma długość 180000 par nukleotydów i zawiera 25 intronów (patrz rys. 7-14B). Nic więc dziwnego, że żaden z klonów biblioteki genomowej nie zawierał kompletnego genu.

W wielu zastosowaniach technologii DNA korzystne jest uzyskanie klonu, który zawiera tylko kodujące sekwencje jakiegoś genu, to znaczy takiego klonu, który nie zawiera DNA stanowiącego introny. Na przykład gen czynnika VIII obejmujący introny i eksony jest to odcinek DNA tak długi i skomplikowany, że konieczna była jego analiza etapami, po kawałku. Co więcej, gdyby chciano wydedukować kompletną sekwencję aminokwasową czynnika VIII na podstawie sekwencji nukleotydowej genu, to określenie sekwencji całego genu izolowanego z biblioteki genomowej byłoby niezwykle nieefektywne, ponieważ jego przeważającą część stanowią introny. Stosunkowo prosto można jednak wyizolować gen pozbawiony wszystkich intronów, co przedstawimy w następnym podrozdziale. Do takich celów wykorzystuje się inny rodzaj biblioteki, określany jako *biblioteka cDNA*.

Rys. 10-18. Technika powszechnie stosowana do wykrywania kolonii bakteryjnych (klonów) zawierających określony gen. Do powierzchni płytki Petriego przyciska się krążek nitrocelulozy, do którego przyklejają się kolonie bakterii, tworząc na nim replikę (odcisk) płytki. Replikę tę umieszcza się następnie w środowisku zasadowym (aby dokonać lizy komórek i rozdzielić dwie nici plazmidowego DNA) i poddaje się hybrydyzacji z silnie promieniotwórczą sondą. Kolonie bakteryjne, które związały sondę, identyfikuje się drogą autoradiografii. Z wyjściowej płytki można teraz wyizolować żywe komórki zawierające potrzebny plazmid

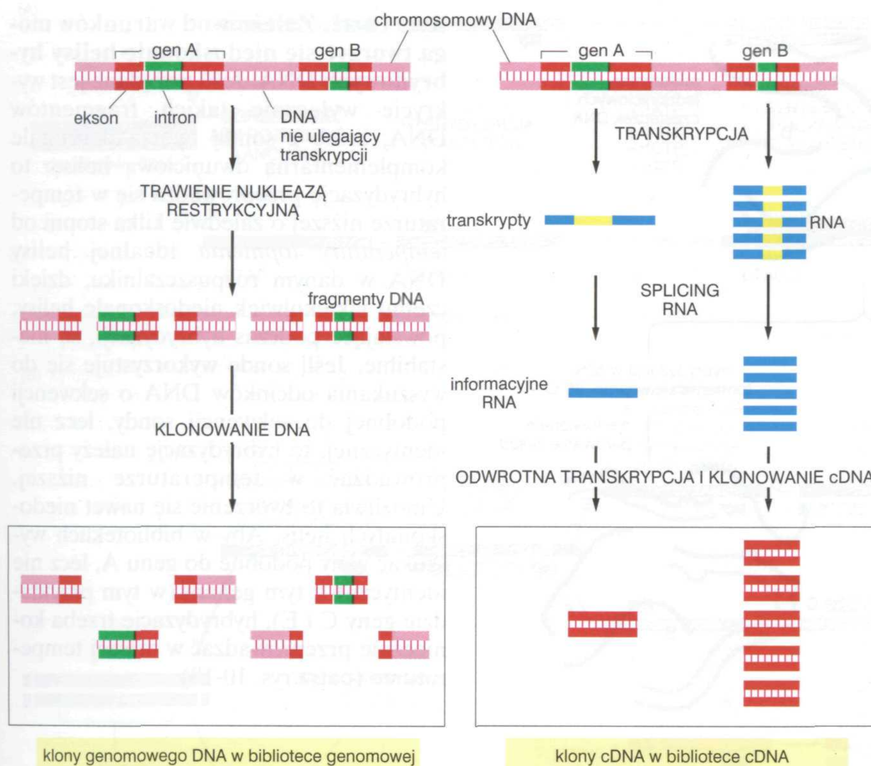
Pytanie 10-5. Każda z sond DNA pokazanych na rys. 10-17 ma długość tylko 15 nukleotydów. Ile miejsc dokładnie komplementarnych do tych sond spodziewałbyś się znaleźć w haploidalnym genomie człowieka ($3 \cdot 10^9$ nukleotydów)? Na podstawie czego mógłbyś się przekonać, że te sondy są komplementarne do genu czynnika VIII?



Rys. 10-19. Synteza cDNA. Z określonej tkanki izoluje się całkowity mRNA i używając odwrotnej transkryptazy (patrz rys. 9-30 i 9-31) z jego cząsteczek przygotowuje się kopie DNA (cDNA). Tutaj dla uproszczenia przedstawiono kopiowanie na cDNA tylko jednego z informacyjnych RNA. Najpierw z mRNA hybrydyzuje się krótki oligonukleotyd komplementarny do ogona poli(A) na końcu 3′ (rozdz. 7), funkcjonujący jako starter dla odwrotnej transkryptazy, która następnie kopiuje mRNA na komplementarny łańcuch DNA tworzący hybrydową helisę DNA/RNA. *Działanie na hybryd alkaliami* powoduje selektywną degradację RNA do poszczególnych nukleotydów. Pozostający jednoniciowy DNA kopiuje się następnie za pomocą polimerazy DNA i powstaje dwuniciowy cDNA. Starterem w tej syntezie jest koniec 3′ jednoniciowego DNA, który zaginając się o 180° tworzy kilka komplementarnych par nukleotydów

Biblioteki cDNA odpowiadają mRNA wytwarzanym w określonych tkankach

Biblioteka ludzkiego cDNA jest o tyle podobna do poprzednio opisanej biblioteki genomowej, że także zawiera liczne klony różnych sekwencji DNA człowieka. Różni się jednak od niej pod jednym ważnym względem. DNA w bibliotece cDNA nie pochodzi bezpośrednio z genomowego DNA (z chromosomów), lecz stanowi zbiór kopii (w postaci DNA) informacyjnych RNA zawartych w określonej tkance lub kulturze komórkowej. Aby przygotować bibliotekę cDNA, należy wyekstrahować z komórek całkowity mRNA i przygotować jego kopie w formie DNA (**cDNA** — DNA komplementarny — ang. complementary) za pomocą enzymu — odwrotnej transkryptazy (rys. 10-19). Otrzymane cDNA są następnie klonowane w taki sam sposób, jak klonuje się fragmenty genomowego DNA, co prowadzi do uzyskania biblioteki cDNA. Wykorzystując taką bibliotekę przygotowaną z wątroby, czyli organu normalnie wytwarzającego czynnik VIII, można było wyizolować kompletną sekwencję kodującą czynnik VIII, pozbawioną intronów. Do wyszukania cDNA czynnika VIII w bibliotece cDNA, jako sondę wykorzystano fragment genomowego DNA tego czynnika oraz procedurę przedstawioną na rys. 10-18. W końcowej części tego rozdziału opiszemy, w jaki sposób sekwencję kodującą czynnik VIII wykorzystano do jego produkcji na skalę handlową.



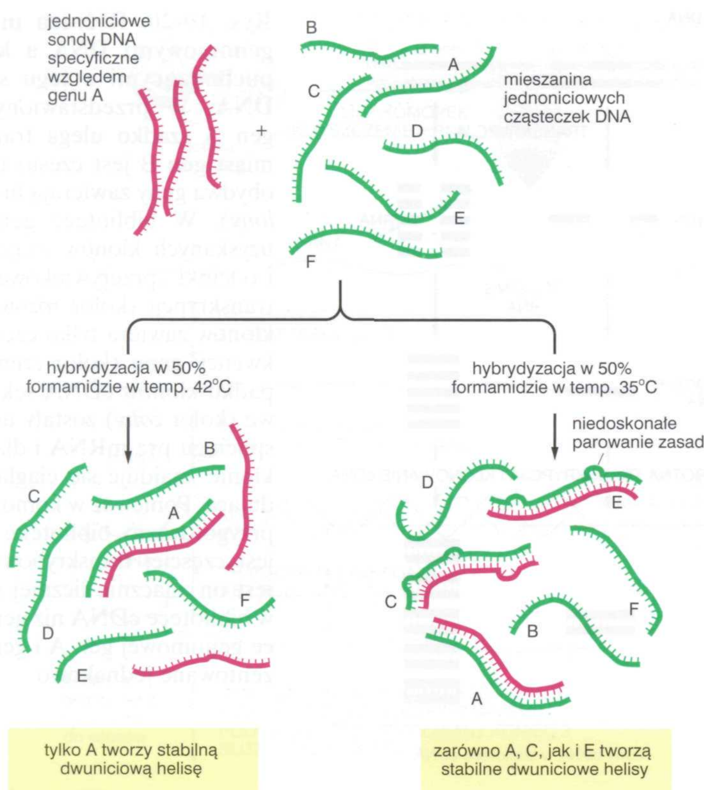
Rys. 10-20. Różnica między klonami genomowymi DNA a klonami cDNA pochodzącymi z tego samego rejonu DNA. W przedstawionym przykładzie gen A rzadko ulega transkrypcji, natomiast gen B jest często transkrybowany; obydwa geny zawierają introny (kolor *zielony*). W bibliotece genomowej wśród uzyskanych klonów znajdują się introny i odcinki „przerywnikowe" nie ulegające transkrypcji (kolor *różowy*), a większość klonów zawiera tylko część kodującej sekwencji genu (kolor *czerwony*). W przypadku klonów cDNA sekwencje intronowe (kolor *żółty*) zostały usunięte podczas splicingu pre-mRNA i dlatego w każdym klonie znajduje się ciągła sekwencja kodująca. Ponieważ w komórkach, z których przygotowano bibliotekę cDNA, gen B jest częściej transkrybowany niż gen A, jest on znacznie liczniej reprezentowany w bibliotece cDNA niż gen A. W bibliotece genomowej gen A i gen B będą reprezentowane jednakowo

Jak przedstawiono na rys. 10-20, między klonami genomowego DNA a klonami cDNA istnieje kilka istotnych różnic. Klony genomowe stanowią przypadkowe próbki wszystkich sekwencji DNA występujących w genomie danego organizmu i z niewielkimi wyjątkami zawierają jednakowe sekwencje niezależnie od typu komórek, z których pochodził DNA. Ponadto genomowe klony otrzymane z organizmów eukariotycznych oprócz sekwencji kodujących białka zawierają duże ilości powtarzających się sekwencji DNA, intronów, rejonów regulatorowych różnych genów oraz „przerywnikowy" DNA. Natomiast klony cDNA zawierają tylko sekwencje kodujące i to tylko tych genów, które ulegają transkrypcji na mRNA w tkance, z której pochodzi RNA. Ponieważ komórki różnych tkanek wytwarzają różne zestawy cząsteczek mRNA, dla każdego rodzaju tkanki uzyskuje się inną bibliotekę cDNA. Biblioteki cDNA konstruuje się także w tym celu, by uzyskać obraz zmian ekspresji genów w komórkach podczas różnych etapów ich rozwoju lub różnicowania się.

Najważniejszą zaletą klonów cDNA jest to, że zawierają one nieprzerwane sekwencje kodujące genów. Tak więc jeśli celem klonowania jest albo dedukcja sekwencji aminokwasowej białka na podstawie sekwencji DNA, albo produkcja dużej ilości białka przez ekspresję klonowanego genu w komórkach bakterii lub drożdży (żadne z nich nie mogą usuwać intronów zawartych w RNA, który jest produktem transkrypcji w komórkach ssaków), istotne jest rozpoczęcie tych działań od cDNA. Podobnie jak biblioteki genomowe, biblioteki cDNA z różnych tkanek stanowią narzędzia badawcze szeroko stosowane w laboratoriach i są też dostępne w handlu.

Hybrydyzacja umożliwia identyfikację genów nawet odlegle spokrewnionych

Jak opisano w rozdz. 9, podczas ewolucji nowe geny powstawały przez duplikację i dywergencję (niezależną ewolucję wyjściowo jednakowych) ge-

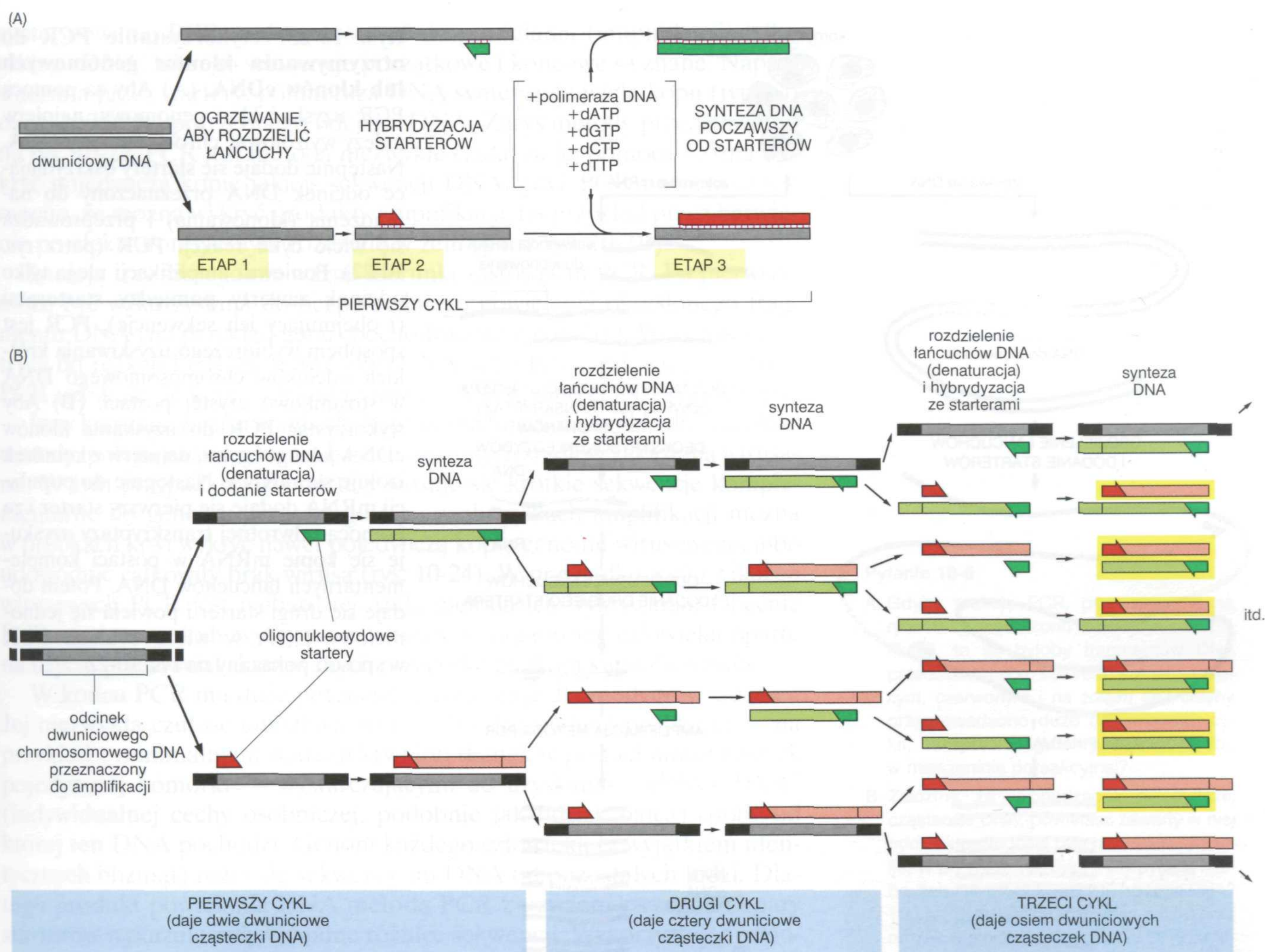


Rys. 10-21. Zależnie od warunków mogą tworzyć się niedoskonałe helisy hybrydowych DNA. Jeśli pożądane jest wykrycie wyłącznie takich fragmentów DNA, które z sondą tworzą doskonale komplementarną dwuniciową helisę, to hybrydyzację przeprowadza się w temperaturze niższej o zaledwie kilka stopni od *temperatury topnienia* idealnej helisy DNA w danym rozpuszczalniku, dzięki czemu jakiekolwiek niedoskonałe helisy, powstające podczas hybrydyzacji, są niestabilne. Jeśli sondę wykorzystuje się do wyszukania odcinków DNA o sekwencji podobnej do sekwencji sondy, lecz nie identycznej, to hybrydyzację należy przeprowadzać w temperaturze niższej. Umożliwia to tworzenie się nawet niedoskonałych helis. Aby w bibliotekach wyszukać geny podobne do genu A, lecz nie identyczne z tym genem (w tym przykładzie geny C i E), hybrydyzację trzeba koniecznie przeprowadzać w niższej temperaturze (patrz rys. 10-18)

nów wcześniej istniejących oraz przez kombinacyjne wykorzystywanie fragmentów starych genów do konstruowania nowych. Z tego powodu dla większości genów istnieją gdzie indziej w obrębie genomu geny pokrewne, z których wiele prawdopodobnie spełnia podobne funkcje. Jak się przekonaliśmy, izolowanie genu wymaga wiele wysiłku, w tym często wstępnego określenia fragmentu sekwencji aminokwasowej białka, a następnie przygotowania i wypróbowania wielu rozmaitych sond. Jeśli jednak już wyizolowano gen należący do jakiejś rodziny genów, to inne geny z tej rodziny można izolować już stosunkowo łatwo, wykorzystując sekwencje pierwszego poznanego genu jako sondy hybrydyzacyjne do wyszukania pozostałych. Ponieważ różne geny tworzące rodzinę genową zwykle nie mają identycznych sekwencji, hybrydyzacje przeprowadza się w warunkach umożliwiających nawet niedoskonałe dopasowanie sondy do odpowiedniego DNA, z którym sonda tworzy wystarczająco stabilną dwuniciową helisę (rys. 10-21). Takie podejście pozwala izolować gen z jednego gatunku (na przykład człowieka) z wykorzystaniem jako sondy odpowiadającego mu genu, pochodzącego z organizmu eksperymentalnie łatwiej dostępnego (na przykład myszy lub muszki owocowej).

Łańcuchowa reakcja polimeryzacji powiela wybrane sekwencje DNA

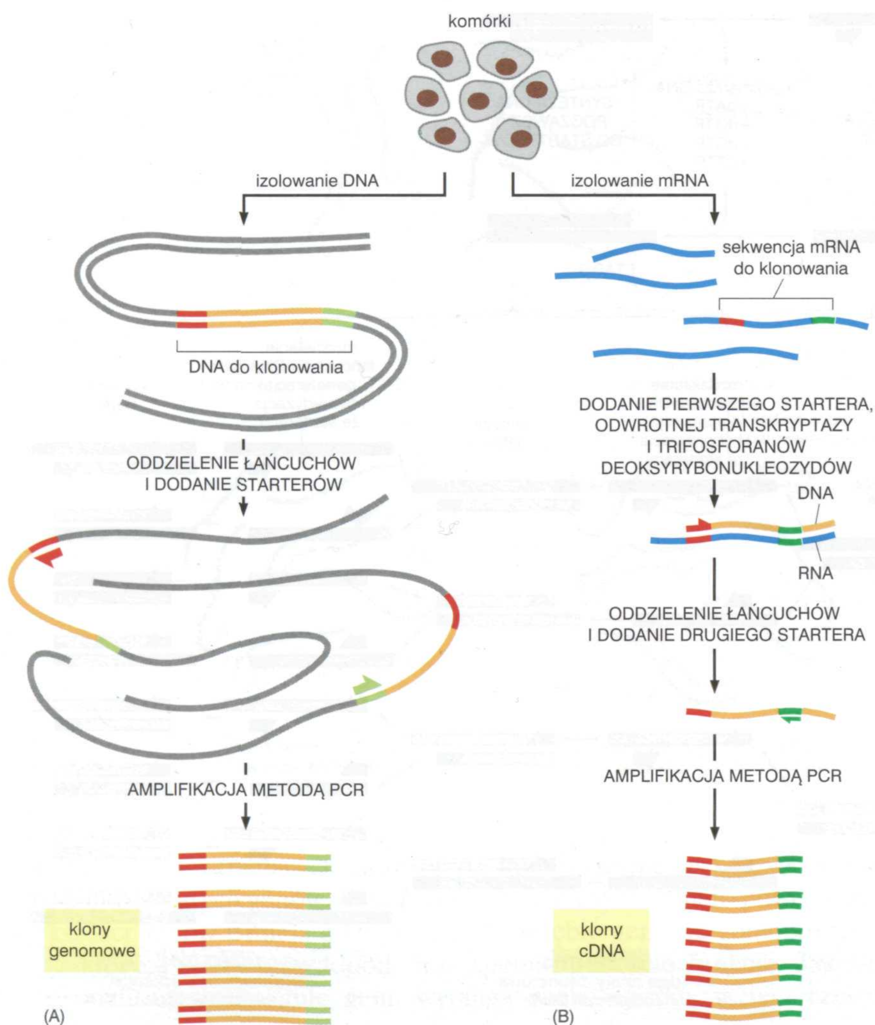
Chociaż klonowanie poprzez biblioteki DNA jest główną drogą uzyskiwania genów, nowsza metoda, wynaleziona około 10 lat temu, stanowi szybszą i tańszą możliwość postępowania w wielu innych zastosowaniach technologii DNA. Ta nowa metoda jest znana jako **łańcuchowa reakcja polimeryzacji** (**PCR**), którą przeprowadza się całkowicie *in vitro*, bez wykorzystywania komórek. Dzięki niej można wybiórczo, bardzo szybko i w dużych ilościach replikować wybrane sekwencje zawarte w dowolnym DNA. Łańcu-



Rys. 10-22. Amplifikacja DNA metodą PCR. Aby powielić jakiś odcinek DNA metodą PCR, należy znać sekwencje nukleotydowe krótkich rejonów oskrzydlających odcinek przeznaczony do amplifikacji. Umożliwia to zaprojektowanie dwóch syntetycznych oligonukleotydów, z których jeden musi być komplementarny do sekwencji oskrzydlającej powielany odcinek DNA po jednej jego stronie, a drugi — po przeciwnej. Oligonukleotydy te służą jako startery do syntezy DNA *in vitro*, katalizowanej przez polimerazę DNA, i równocześnie określają długość powielanego odcinka DNA. (A) Punktem wyjścia PCR jest dwuniciowy DNA i każdy cykl reakcji rozpoczyna się od krótkiego ogrzania dwuniciowej cząsteczki w celu oddzielenia od siebie poszczególnych jej łańcuchów (etap 1). Po oddzieleniu łańcuchów mieszaninę reakcyjną oziębia się w obecności dużego molowego nadmiaru obydwóch oligonukleotydów starterowych, co powoduje ich hybrydyzację z komplementarnymi sekwencjami na końcach rejonu powielanego (etap 2). Mieszaninę inkubuje się następnie z polimerazą DNA i czterema trifosforanami deoksyrybonukleozydów, dzięki czemu zachodzi synteza DNA, rozpoczynająca się od każdego z dwóch starterów (etap 3). Cykl reakcji powtarza się od termicznej dysocjacji nowo utworzonych dwuniciowych cząsteczek DNA. W metodzie tej wykorzystuje sie specjalną polimerazę DNA, izolowaną z bakterii termofilnych; polimeraza ta jest trwała w temperaturach znacznie wyższych niż eukariotyczna polimeraza DNA. Dzięki temu nie ulega denaturacji podczas termicznej denaturacji DNA (etap 1) i nie trzeba jej dodawać po każdym cyklu reakcji.

(B) W miarę jak procedura jest stale powtarzana, nowo zsyntetyzowane fragmenty służą jako matryce w kolejnych rundach powtarzających się reakcji i po kilku cyklach w mieszaninie dominuje DNA zawarty pomiędzy sekwencjami oskrzydlającymi i wydłużony o te sekwencje. W praktyce do amplifikacji określonego DNA wystarcza zwykle 20–30 cykli. Podczas każdego cyklu podwaja się ilość DNA zawarta w mieszaninie na jego początku. Jeden cykl zwykle trwa tylko około 5 minut. Zautomatyzowanie całej procedury umożliwia bezkomórkowe namnożenie dowolnego fragmentu DNA w czasie kilku godzin, co należy porównać z kilkoma dniami potrzebnymi do klonowania DNA technikami klasycznymi. Podczas reakcji powielane są tylko te odcinki DNA, które w wyjściowej cząsteczce są oskrzydlone sekwencjami komplementarnymi do starterów, ponieważ startery nie wiążą się z innymi miejscami wyjściowego DNA.

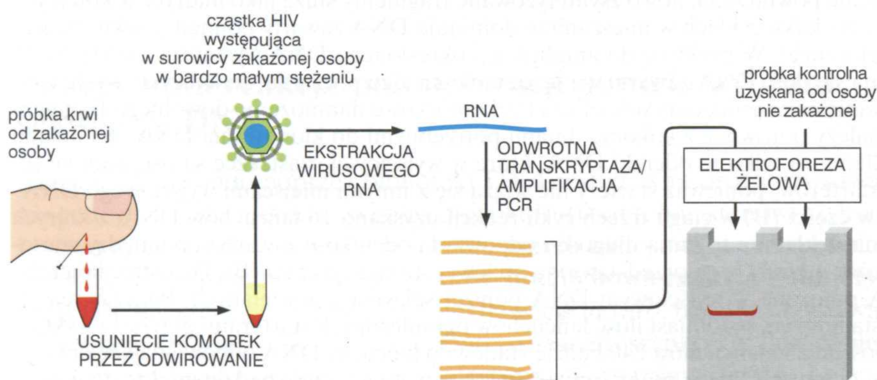
W przykładzie przedstawionym w części (B) w ciągu trzech cykli reakcji uzyskano 16 łańcuchów DNA, z których 8 (przedstawionych na *żółtym tle*) ma dokładnie tę samą długość i odpowiada odcinkom zawartym pomiędzy starterami, wydłużonym o długość starterów; odcinki te są przedstawione po lewej stronie rysunku (B). Pozostałe łańcuchy zawierają dodatkowe odcinki DNA położone w wyjściowym DNA poniżej sekwencji powielanych. Podczas reakcji PCR ilość takich łańcuchów przyrasta liniowo, natomiast ilość łańcuchów ograniczonych starterami przyrasta wykładniczo. Po trzech dalszych cyklach spośród 256 łańcuchów 240 będzie stanowiło łańcuchy DNA odpowiadające dokładnie sekwencji powielanej, a po kilku dalszych cyklach praktycznie cały DNA w mieszaninie będzie miał tę długość



Rys. 10-23. Wykorzystanie PCR do otrzymywania klonów genomowych lub klonów cDNA. (A) Aby za pomocą PCR uzyskać klon genomowy, najpierw należy wyizolować chromosomowy DNA. Następnie dodaje się startery oskrzydlające odcinek DNA przeznaczony do namnożenia (klonowania) i przeprowadza się wiele cykli reakcji PCR (patrz rys. 10-22). Ponieważ amplifikacji ulega tylko odcinek zawarty pomiędzy starterami (i obejmujący ich sekwencje), PCR jest sposobem wybiórczego uzyskiwania krótkich odcinków chromosomowego DNA w stosunkowo czystej postaci. (B) Aby wykorzystać PCR do uzyskania klonów cDNA jakiegoś genu, najpierw z komórek izoluje się mRNA. Następnie do populacji mRNA dodaje się pierwszy starter i za pomocą odwrotnej transkryptazy uzyskuje się kopie mRNA w postaci komplementarnych łańcuchów DNA. Potem dodaje się drugi starter i powiela się jednoniciowy DNA w wielu cyklach PCR w sposób pokazany na rys. 10-22

chowa reakcja polimeryzacji jest obecnie szeroko stosowana, na przykład do diagnozowania genów powodujących choroby lub do uzyskiwania dużych ilości jakiegokolwiek genu z małej próbki DNA człowieka.

PCR opiera się na wykorzystaniu polimerazy DNA do kopiowania matrycowego DNA w powtarzanych rundach replikacji. Polimeraza jest naprowadzana na sekwencje przeznaczone do skopiowania przez krótkie oligonukleotydy starterowe, które hybrydyzują z matrycowym DNA na początku i na końcu powielanej sekwencji DNA. Oligonukleotydy te są tak skonstruowane, by mogły stanowić startery do replikacji każdej z nici wyjściowego dwuniciowego DNA. Ponieważ startery muszą być chemicznie



Rys. 10-24. Wykorzystanie PCR do wykrywania w próbce krwi genomów wirusowych. Genom ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV), wywołującego AIDS, jest cząsteczką jednoniciowego RNA (patrz rys. 9-30). Dzięki możliwości powielania dowolnej cząsteczki kwasu nukleinowego, PCR jest niezwykle czułą metodą wykrywania śladowych ilości wirusa w próbce krwi lub w tkance, nie wymagającą jego izolowania i oczyszczenia. Podobnie jak HIV, za pomocą PCR monitoruje się wiele innych wirusów zakażających ludzi

syntetyzowane, PCR można stosować do powielania (amplifikacji) tylko takiego DNA, którego sekwencje początkowe i końcowe są znane. Naprowadzana przez startery, polimeraza DNA syntetyzuje wiele kopii (typowo około miliarda) potrzebnego odcinka DNA. Zarys metody przedstawiono na rys. 10-22. PCR jest metodą niezwykle czułą; za jej pomocą można wykryć pojedynczą kopię jakiejś sekwencji DNA, gdyż PCR powiela ją tak mocno, że można wykryć produkty amplifikacji, na przykład przez barwienie po elektroforetycznym rozdziale w żelu (patrz rys. 10-3B).

Istnieją trzy szczególnie ważne kierunki zastosowań PCR. Po pierwsze, może być wykorzystana do bezpośredniego powielenia określonego fragmentu DNA (na przykład genu) pochodzącego z komórki. Wyjściową matrycą do reakcji PCR może być albo DNA, albo RNA, tak więc w drodze PCR uzyskuje się kopie albo genomowego DNA, albo cDNA (rys. 10-23).

Inny kierunek zastosowania PCR, wykorzystujący niezwykle dużą czułość metody, polega na wykrywaniu bardzo wczesnych stadiów zakażenia wirusami. W tym przypadku jako startery stosuje się krótkie sekwencje komplementarne do genomu wirusowego i po wielu cyklach amplifikacji można w próbkach krwi wykryć nawet pojedynczą kopię genomu wirusowego, albo udowodnić całkowity brak wirusa (rys. 10-24). W przypadku wielu zakażeń wirusowych PCR jest najbardziej czułą metodą ich wykrywania. Obecnie PCR wypiera metody wykrywania wirusów w organizmie człowieka oparte na użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko białkom kapsydu wirusa.

W końcu PCR ma duże potencjalne znaczenie dla medycyny sądowej. Jej niezwykła czułość umożliwia pracę z bardzo małymi próbkami — na przykład z minimalnymi śladami krwi lub tkanek w postaci nawet resztek pojedynczej komórki — wystarczającymi do uzyskania *„odcisku DNA"* (indywidualnej cechy osobniczej, podobnie jak odcisk palca) osoby od której ten DNA pochodzi. Genom każdego człowieka (z wyjątkiem identycznych bliźniąt) różni się sekwencjami DNA od pozostałych ludzi. Dlatego produkt powielania DNA metodą PCR z użyciem szczególnej pary starterów wykazuje indywidualne różnice sekwencji. Wykorzystując odpowiednio dobrany zestaw par starterów, komplementarnych do znanych silnie zmiennych rejonów ludzkiego genomu, za pomocą PCR można tworzyć „odciski DNA" osobniczo różne i charakterystyczne dla każdego poszczególnego człowieka (rys. 10-25, rys. na następnej stronie).

Pytanie 10-6

A. Gdyby reakcję PCR, przedstawioną na rys. 10-22, wydłużono o dwa cykle amplifikacji, to ile byłoby fragmentów DNA przedstawionych kolorem *szarym*, *zielonym*, *czerwonym* i na *żółtym* tle? Gdyby przeprowadzono dużo dodatkowych cykli, to które fragmenty dominowałyby w mieszaninie poreakcyjnej?

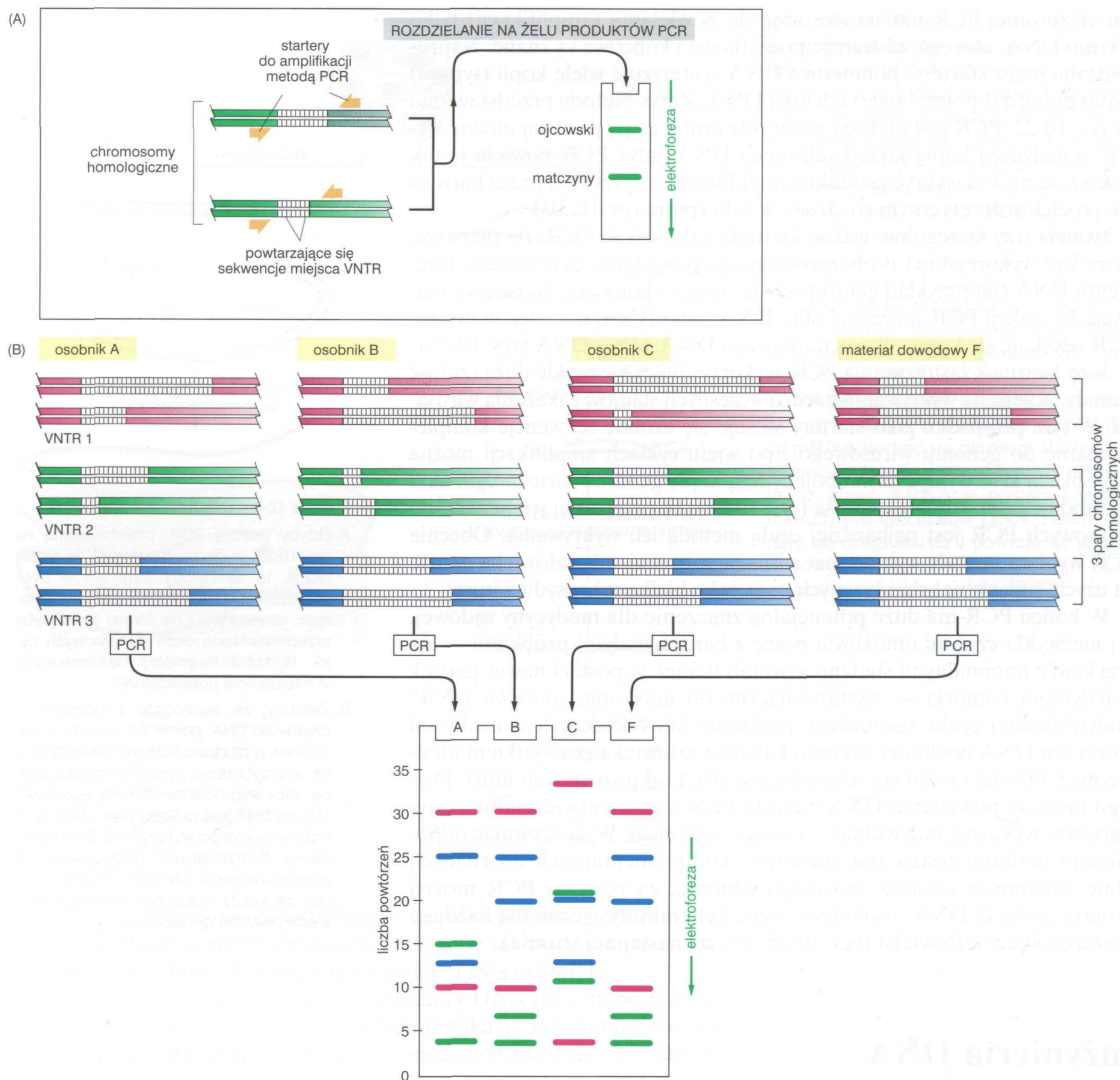
B. Załóżmy, że wychodząc z pojedynczej cząsteczki DNA, powielasz zawarty w niej odcinek o długości 500 par nukleotydów. Ile, w przybliżeniu, cykli PCR byłoby trzeba, żeby wyprodukować 100 ng tego DNA? 100 ng DNA jest to ilość, jaką z łatwością można wykryć po wybarwieniu DNA barwnikami fluoryzującymi. (Wskazówka: do przeprowadzenia obliczeń można przyjąć, że każdy nukleotyd ma masę cząsteczkową 330 g/mol.)

Inżynieria DNA

Niniejsza część rozdziału przedstawia, w jaki sposób metody poprzednio omówione, dostarczając nowych narzędzi do badania funkcjonowania genów, cząsteczek RNA i białek, zrewolucjonizowały biologię komórki w jej wszystkich aspektach.

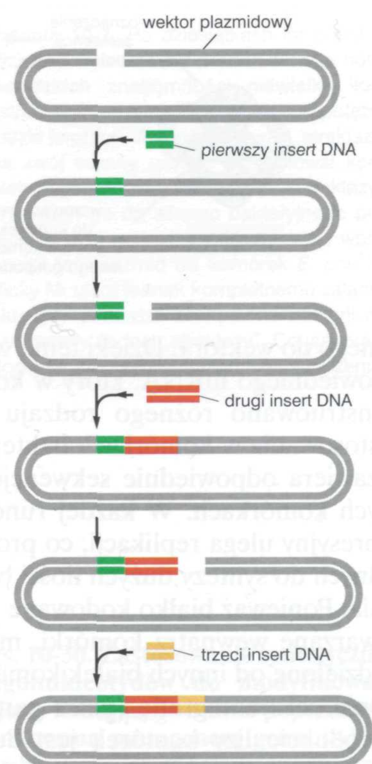
Można skonstruować całkowicie nowe cząsteczki DNA

Jak widzieliśmy, zrekombinowane cząsteczki DNA na ogół uzyskuje się przez łączenie dwóch cząsteczek DNA, używając ligazy DNA (patrz rys. 10-12). W tworzeniu biblioteki DNA jedną z tych cząsteczek jest wektor, będący zwykle plazmidem lub wirusem, drugą natomiast — fragment chromosomu lub cząsteczka cDNA (patrz rys. 10-16). Tak zrekombinowane cząsteczki mogą z kolei służyć jako wektory do insercji i klonowania jeszcze innego DNA i powtarzając tę procedurę można uzyskać i klonować DNA różniący się od jakiegokolwiek DNA występującego naturalnie



Rys. 10-25. Zastosowanie PCR w praktyce prawniczej. (A) Rejony DNA decydujące o zmienności wykorzystywanej do tego typu analiz obejmują ciągi krótkich powtarzających się sekwencji takich jak GTGTGT..., występujące w różnych miejscach (loci) genomu człowieka. Liczba powtórzeń w każdym ciągu takich sekwencji jest w populacji ludzkiej bardzo zmienna i waha się u poszczególnych osób od 4 do 40. Ciąg powtarzających się sekwencji nukleotydowych tego typu określa się powszechnie jako VNTR (ang. variable number of tandem repeat). Ze względu na dużą zmienność tych sekwencji, każdy człowiek zwykle dziedziczy inny wariant miejsc VNTR od matki i inny od ojca. Dwie nie spokrewnione osoby nie zawierają takich samych par tych sekwencji. Reakcja PCR przeprowadzona z wykorzystaniem starterów oskrzydlających miejsce VNTR prowadzi dlatego do uzyskania w przypadku każdej osoby pary prążków powielonego DNA, z których jeden reprezentuje wariant matczyny, a drugi wariant ojcowski tego miejsca (genom każdego osobnika zawiera wiele takich miejsc). Długość produktów amplifikacji, a więc także ich względne położenie na żelu po elektroforezie, zależy od liczby powtórzeń krótkich sekwencji w miejscu VNTR. (B) Prążki (pasma) DNA uzyskane w trzech różnych reakcjach PCR, z których każda prowadziła do amplifikacji DNA z innego miejsca VNTR. W pokazanym tu schematycznie przykładzie analizowano odpowiadające sobie trzy loci VNTR osób podejrzanych (osobnicy A, B i C), obserwując u każdej osoby 6 prążków DNA. Układ prążków każdego osobnika służy jako jego „odcisk DNA", umożliwiający identyfikację. W czwartej ścieżce (F) na żelu są produkty tych samych reakcji PCR przeprowadzonych na materiale dowodowym. Materiałem tym może być pojedynczy włos pozostawiony na miejscu przestępstwa. Z przedstawionego przykładu wynika, że osobnicy A i C mogą być oczyszczeni z podejrzeń, natomiast osobnik B ewidentnie powinien zostać oskarżony

Rys. 10-26. **Klonowanie seryjne można zastosować do złożenia razem zestawu fragmentów DNA pochodzących z różnych genów.** Po każdym etapie wprowadzania insertu zrekombinowany plazmid klonuje się w celu namnożenia i izolacji (patrz rys. 10-15). Zrekombinowana cząsteczka zostaje następnie rozcięta nukleazą restrykcyjną w miejscu pokazanym na rysunku i wykorzystana jako wektor do klonowania kolejnego fragmentu DNA



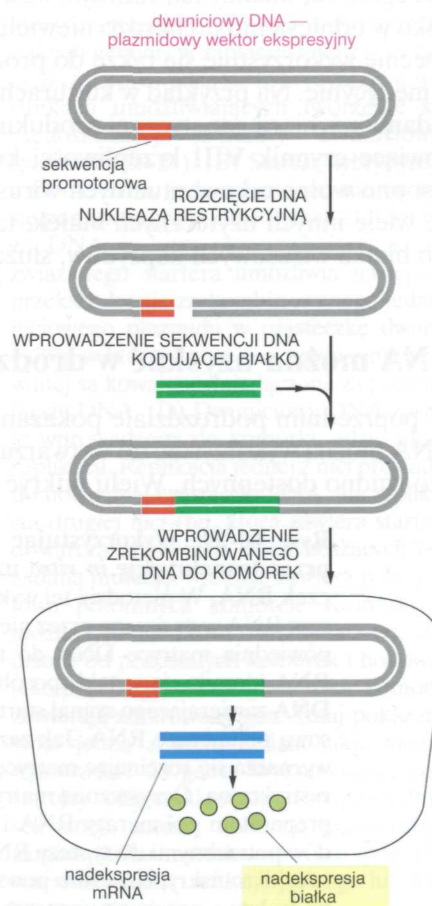
(rys. 10-26). Taki nowy DNA może powstać w drodze różnych kombinacji naturalnych fragmentów DNA lub być w całości zsyntetyzowany przez eksperymentatora metodami chemicznymi, stosownie do celów doświadczenia. Powtarzając etapy klonowania DNA można łączyć w różnych kombinacjach syntetyczne odcinki DNA z fragmentami występującymi naturalnie, co w rezultacie pozwala otrzymać długie cząsteczki DNA o dowolnej pożądanej sekwencji. Jednym z najważniejszych zastosowań takich sekwencji — przygotowywanych na zamówienie — jest wydajna produkcja białek występujących w komórkach w małych ilościach.

Stosując klonowany DNA można wytwarzać duże ilości białek nielicznie występujących w komórkach

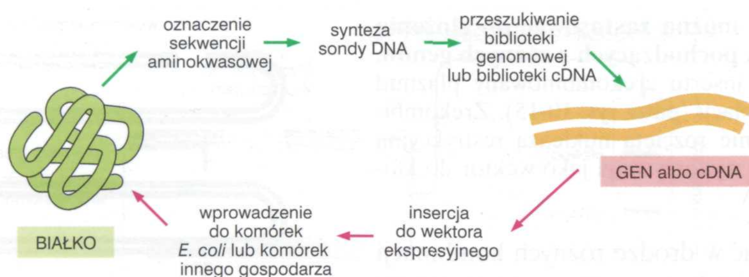
Do niedawna można było badać tylko białka wytwarzane przez komórki w stosunkowo dużych ilościach. Wychodząc z kilkuset gramów komórek można było drogą kolejnych etapów chromatograficznych wyizolować jakieś białko stanowiące 1% lub więcej ogólnego białka komórki (patrz panel 5-5, s. 162–163), uzyskując około 0,1 g (100 mg) czystego preparatu. Taka ilość wystarczy, by określić konwencjonalnymi metodami sekwencję aminokwasów, zanalizować aktywność biologiczną białka (na przykład jakiego rodzaju reakcję może ono katalizować) i uzyskać przeciwciała skierowane przeciwko temu białku, wykorzystywane następnie do określenia lokalizacji białka w komórce. Ponadto jeśli udało się wyhodować odpowiedni kryształ (co często jest trudnym zadaniem), to można było określić przestrzenną budowę tego białka metodami rentgenowskiej analizy struktury (patrz panel 5-6, s. 164–165). W ten sposób zbadano strukturę i funkcję wielu białek występujących obficie, między innymi hemoglobiny izolowanej z czerwonych krwinek.

Jednak większość z tysięcy różnych białek zawartych w komórce eukariotycznej (w tym białka pełniące bardzo istotne funkcje), występuje w komórce w bardzo małych ilościach. Dlatego też uzyskanie więcej niż kilku mikrogramów czystych preparatów takich białek jest niezwykle trudne, jeśli w ogóle możliwe. Jednym z najważniejszych osiągnięć inżynierii genetycznej w dziedzinie biologii komórki jest umożliwienie produkcji dużych ilości dowolnego białka, w tym białek rzadko występujących.

Zwykle osiąga się ten cel posługując się specjalnie skonstruowanymi wektorami, określanymi jako *wektory ekspresyjne*. W odróżnieniu od wcześniej opisanych wektorów do klonowania, wektory ekspresyjne zawierają odpowiednie sekwencje regulatorowe i promotorowe, które w komórce umożliwiają skuteczną transkrypcję przyległugo do nich DNA wprowa-



Rys. 10-27. **Wytwarzanie dużych ilości białka przez klonowanie sekwencji DNA, kodującej to białko, w wektorze ekspresyjnym wprowadzonym do komórek.** Skonstruowano plazmidowy wektor, który zawiera bardzo aktywny promotor, powodujący intensywną transkrypcję przyległego odcinka DNA, kodującego białko. Sekwencję taką wprowadza się do plazmidowego wektora ekspresyjnego. Zależnie od charakteru wektora, zrekombinowany plazmid jest wprowadzany do komórek bakterii, drożdży, owadów lub ssaków, w których zawarty w plazmidzie gen ulega efektywnie transkrypcji, a następnie translacji do białka



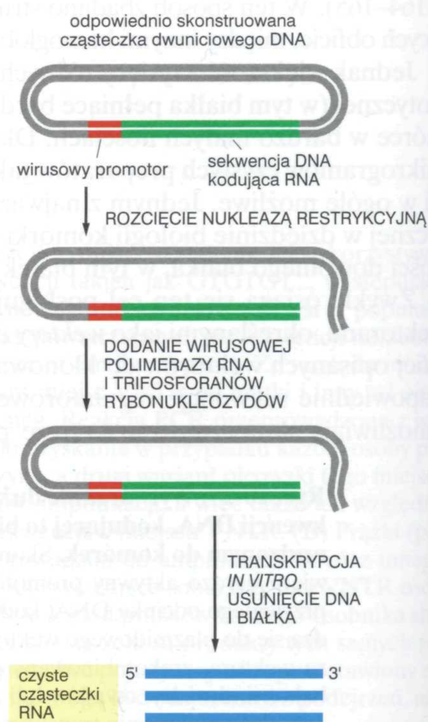
Rys. 10-28. Znajomość biologii molekularnej komórek umożliwia eksperymentalne przechodzenie od genu do białka i od białka do genu. Niewielka ilość oczyszczonego białka wystarczy do określenia jego częściowej sekwencji aminokwasów. Dostarcza to informacji potrzebnych, by wyszukać odpowiedni gen w bibliotece genomowej lub bibliotece cDNA (patrz rys. 10-18). Po sklonowaniu DNA jego sekwencję kodującą białko można wykorzystać do wytwarzania dużych ilości białka w komórkach zmienionych metodami inżynierii genetycznej (patrz rys. 10-27)

dzonego do wektora. Dzięki temu wektory te kierują syntezą dużych ilości odpowiedniego mRNA, który w komórkach ulega translacji (rys. 10-27). Skonstruowano różnego rodzaju wektory ekspresyjne przeznaczone do stosowania w komórkach bakterii, drożdży, owadów lub ssaków, każdy zawiera odpowiednie sekwencje regulujące transkrypcję i translację w tych komórkach. W każdej rundzie podziałów komórkowych wektor ekspresyjny ulega replikacji, co prowadzi do powstania kultury komórek zdolnych do syntezy dużych ilości białka stanowiącego obiekt zainteresowania. Ponieważ białko kodowane przez wektor ekspresyjny z reguły jest wytwarzane wewnątrz komórki, musi być ono wyizolowane z komórek i oddzielone od innych białek komórkowych — przez lizę komórek, a następnie chromatografię (patrz panel 5-4, s. 160–161). Ponieważ jednak w produkcie lizy komórek jest dużo tego białka (często stanowi ono 1–10% wszystkich białek zawartych w komórce), oczyszcza się je zwykle łatwo i to w zaledwie kilku etapach.

Techniki tego rodzaju wykorzystano, by otrzymać liczne białka ważne dla biologii komórki w ilościach wystarczających do przeprowadzenia szczegółowej analizy ich funkcji i struktury, co poprzednio było możliwe tylko w odniesieniu do bardzo niewielu białek (rys. 10-28). Technologię tę obecnie wykorzystuje się także do produkcji dużych ilości białek ważnych w medycynie. Na przykład w kulturach komórek ssaków zmienionych metodami inżynierii genetycznej produkuje się na skalę handlową białko stanowiące czynnik VIII krzepliwości krwi. Dzięki takiemu postępowaniu jest ono wolne od ewentualnych wirusów. W podobny sposób produkuje się wiele innych użytecznych białek, takich jak insulina, hormon wzrostu lub białka wirusowych kapsydów, służące jako szczepionki.

RNA można uzyskać w drodze transkrypcji *in vitro*

W poprzednim podrozdziale pokazano, jak rekombinacyjną technologię DNA można wykorzystać do wytwarzania dużych ilości białek, nawet bardzo trudno dostępnych. Wielu odkryć omawianych w tej książce dokona-



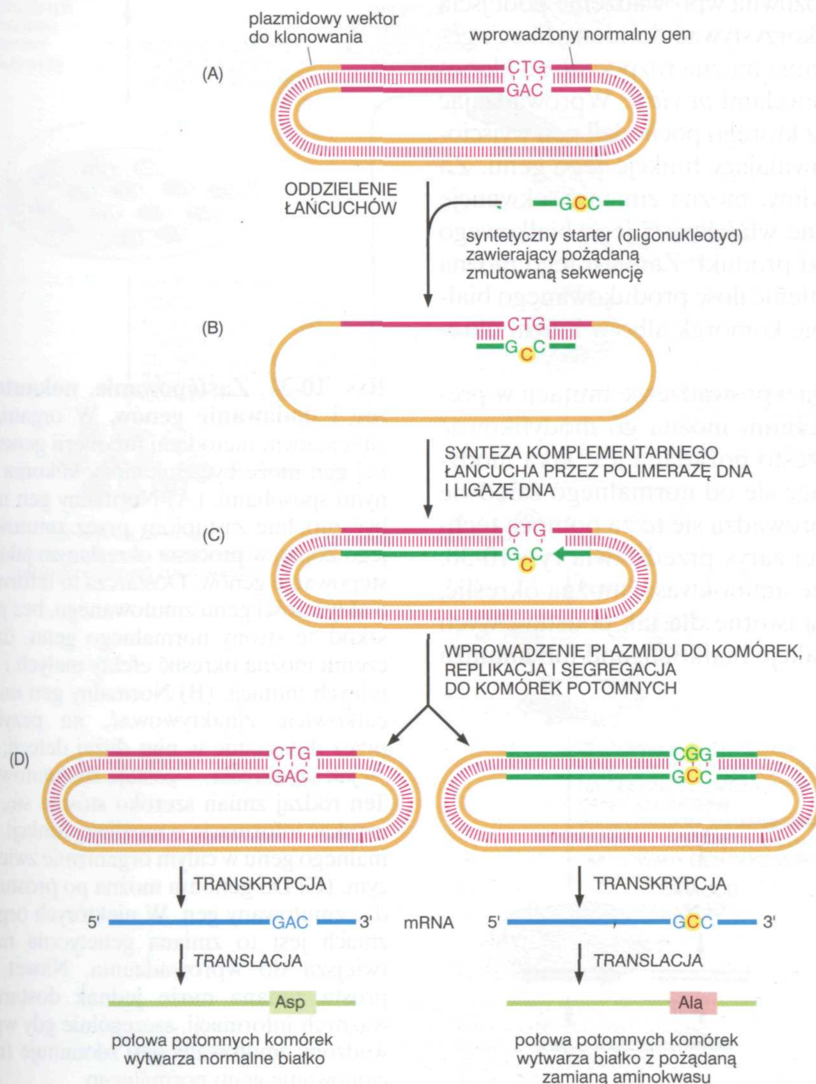
Rys. 10-29. Wykorzystując wirusową polimerazę RNA można przez transkrypcję *in vitro* uzyskać duże ilości dowolnych cząsteczek RNA. W metodzie tej wykorzystuje się niezwykle wydajne polimerazy RNA wytwarzane przez niektóre bakteriofagi. Aby przygotować odpowiednią matrycę DNA do transkrypcji, sekwencję DNA kodującą RNA klonuje się w taki sposób, by była ona przyłączona do segmentu DNA zawierającego sygnał startu (promotor) rozpoznawany przez wirusową polimerazę RNA. Jak zaznaczono, przyszły koniec 3′ transkryptu wyznacza się rozcinając matrycę DNA w unikatowym miejscu nukleazą restrykcyjną. Oczyszczoną matrycę DNA miesza się następnie z czystym preparatem polimerazy RNA i czterema trifosforanami rybonukleozydów potrzebnymi do syntezy RNA (ATP, CTP, GTP, UTP). Podczas wielu cykli transkrypcji *in vitro* powstają duże ilości pożądanego RNA. Można go łatwo oczyścić z pozostałych składników mieszaniny inkubacyjnej

no stosując DNA i białka uzyskane właśnie w ten sposób. Jednak liczne badania związane z biologią komórki wymagają uzyskiwania także czystych cząsteczek RNA. Na przykład badania splicingu RNA, syntezy białka lub właściwości rybozymów (patrz rozdz. 7) może znacznie ułatwić dostępność czystych cząsteczek RNA. Większość RNA występuje w komórkach tylko w bardzo małych ilościach, a ich wyodrębnienie spośród wielu innych składników komórek, szczególnie wielu tysięcy podobnych RNA, jest bardzo trudne. Do wytworzenia dużych ilości dowolnego RNA można jednak wykorzystać technologię DNA, pod warunkiem, że wyizolowano już jego gen. Najbardziej efektywna metoda polega na syntezie RNA *in vitro*, co umożliwia uzyskanie RNA stanowiącego obiekt zainteresowania, wolnego od zanieczyszczeń innymi cząsteczkami RNA (rys. 10-29).

Pytanie 10-7. Po dziesiątkach lat pracy dr Ricky M. wyizolował z próbek włosów hollywoodzkich znakomitości niewielką ilość „atraktazy", enzymu produkującego potężny ludzki feromon. Aby produkować „atraktazę" na swój własny użytek, przygotował kompletny genomowy klon genu „atraktazy", przyłączył go do silnego bakteryjnego promotora w ekspresyjnym plazmidzie i wprowadził ten plazmid do komórek *E. coli*. Dr Ricky M. uległ jednak kompletnemu załamaniu, gdy stwierdził że komórki bakterii nie wytwarzały żadnej „atraktazy". Co jest prawdopodobną przyczyną jego niepowodzenia?

Organizmy zmutowane najlepiej ujawniają funkcje genów

Dotychczas w tym rozdziale zakładaliśmy, że funkcje jakiegoś klonowanego genu są znane. Przypuśćmy jednak, że został sklonowany gen kodujący białko o nieznanej funkcji. Jak można określić funkcję tego białka w komórce lub w całym organizmie? Obecnie, gdy programy sekwencjonowania genomów szybko ujawniają nowe geny na podstawie samej tylko sekwencji DNA,



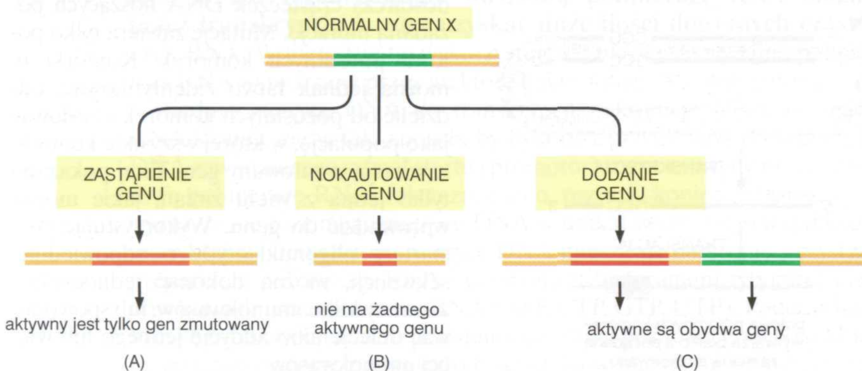
Rys. 10-30. Zastosowanie syntetycznych oligonukleotydów do modyfikowania rejonu kodującego białko poprzez ukierunkowaną mutagenezę genu. (A) Zrekombinowany plazmid zawierający dodatkowo wprowadzony gen rozdziela się na dwie pojedyncze nici. Do jednoniciowego DNA dodaje się jako starter replikacji syntetyczny oligonukleotyd komplementarny do części genu, ale zawierający jeden nukleotyd zmieniony (w porównaniu z oryginalnym genem) w zaplanowanej z góry pozycji i przeprowadza się hybrydyzację w warunkach umożliwiających tworzenie się niedoskonałej struktury dwuniciowej (patrz rys. 10-21). (B) Starter hybrydyzuje z DNA, ale w jednym miejscu nie tworzy się poprawna para nukleotydów. (C) Synteza DNA *in vitro* rozpoczynająca się od związanego startera umożliwia następnie przekształcenie zrekombinowanego jednoniciowego plazmidu w cząsteczkę dwuniciową, w której końce nici nowo syntetyzowanej są kowalencyjnie łączone za pomocą ligazy DNA. (D) Dwuniciowy DNA zostaje wprowadzony do komórki, gdzie ulega replikacji. Replikacja jednej z nici prowadzi do normalnej cząsteczki DNA, ale replikacja drugiej nici (tej, która zawiera starter) dostarcza cząsteczek DNA noszących pożądaną mutację. Mutację zawiera tylko połowa potomnych komórek. Komórki te można jednak łatwo zidentyfikować, oddzielić od pozostałych komórek i hodować jako populację, w której wszystkie komórki zawierają zmutowany gen. Tutaj pokazano tylko jedną z wielu zmian, jakie można wprowadzić do genu. Wykorzystując jako startery oligonukleotydy o odpowiedniej sekwencji, można dokonać jednocześnie zamiany kilku aminokwasów, lub spowodować delecję albo addycję jednego lub więcej aminokwasów

w biologii komórki często pojawiają się pytania o funkcje takich genów. Aby wydedukować funkcję jakiegoś białka, nie wystarczy znać sekwencję genu kodującego to białko ani nawet jego budowę przestrzenną. Wiele białek — takich jak białka strukturalne komórki lub wchodzące w skład dużych kompleksów wieloenzymatycznych — nie wykazuje jakiejś własnej aktywności. Nawet białka o znanej aktywności biologicznej (na przykład białka motoryczne lub kinazy białkowe) w zasadzie mogą uczestniczyć w różnych procesach komórkowych i aktualny sposób wykorzystania tych białek przez komórkę nie zawsze jasno wynika z ich aktywności biochemicznych.

Rozwiązania tego problemu dostarcza genetyka. W jasny sposób funkcje określonego białka ujawniają mutanty, w których jego właśnie brak. Jeszcze użyteczniejsze są mutanty syntetyzujące zmienione białko, które może poprawnie funkcjonować tylko w pewnym wąskim przedziale temperatur. Białka takie można inaktywować przez podwyższenie lub obniżenie temperatury. W mutantach tego typu można dzięki temu „włączać" lub „wyłączać" stan nienormalności w prosty sposób, zmieniając temperaturę. Zanim wprowadzono techniki oparte na klonowaniu genów, funkcje większości znanych wtedy genów określano właśnie w ten sposób, na podstawie rodzaju procesów fizjologicznych lub komórkowych, na które miała wpływ mutacja. Takie genetyczne podejście najłatwiej stosować do organizmów, które szybko się rozmnażają i do których można łatwo wprowadzić mutacje w warunkach laboratoryjnych, jak bakterie, drożdże, nicienie lub muszki owocowe.

Rekombinacyjna technologia DNA umożliwiła wprowadzenie podejścia genetycznego innego rodzaju. Zamiast wykorzystywać do identyfikacji genu i jego białka mutacje przypadkowe, badania można rozpocząć od klonowanego genu, poddanego mutagenezie metodami *in vitro*. Wprowadzając zmieniony gen z powrotem do organizmu, z którego pochodził gen wyjściowy, można uzyskać organizm mutanta, ujawniający funkcje tego genu. Za pomocą technik, które wkrótce przedstawimy, można zmienić sekwencję kodującą genu tak, by zmienić funkcjonalne właściwości jego białkowego produktu lub by w ogóle wyeliminować taki produkt. Zamiast tego można zmienić rejon regulatorowy genu tak, by zmienić ilość produkowanego białka lub by gen ulegał ekspresji w innym typie komórek albo w innym okresie rozwoju organizmu.

Manipulowanie DNA *in vitro* umożliwia wprowadzenie mutacji w precyzyjnie określone miejsce genu, dzięki czemu można go modyfikować w bardzo subtelny sposób. Na przykład często pożądana jest taka modyfikacja genu, by kodował on białko różniące się od normalnego zaledwie jednym lub kilkoma aminokwasami. Przeprowadza się to za pomocą techniki **mutagenezy ukierunkowanej**, której zarys przedstawia rys. 10-30. Zmieniając w ten sposób w białku wybrane aminokwasy, można określić, które rejony łańcucha polipeptydowego są istotne dla tak podstawowych procesów, jak fałdowanie się białek, interakcje białko–ligand lub kataliza enzymatyczna.

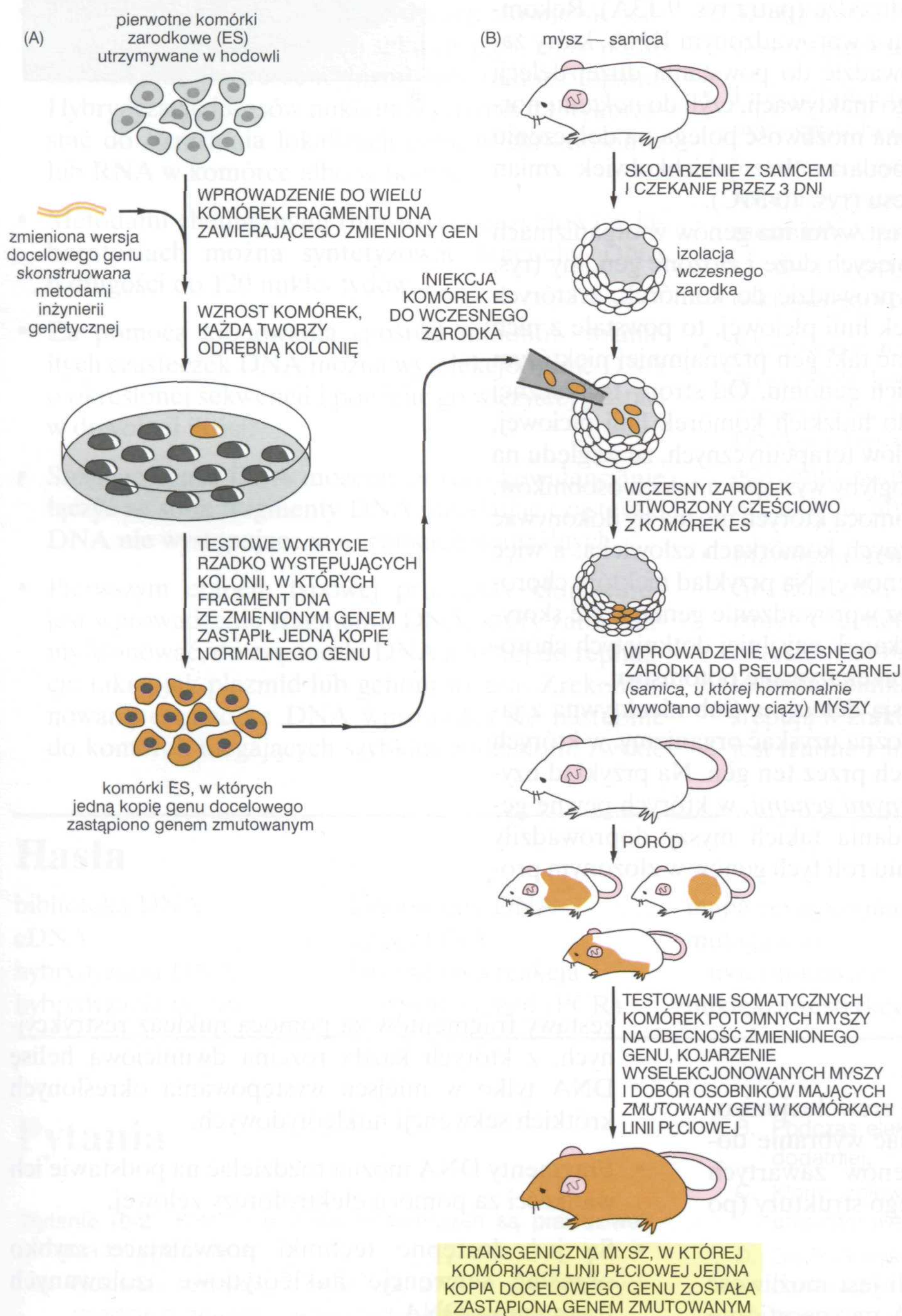


Rys. 10-31. Zastępowanie, nokautowanie i dodawanie genów. W organizmie zmienianym metodami inżynierii genetycznej gen może być zmieniony kilkoma różnymi sposobami. (A) Normalny gen może być zupełnie zastąpiony przez zmutowaną jego kopię, w procesie określanym jako zastępowanie genów. Dostarcza to informacji o aktywności genu zmutowanego, bez przeszkód ze strony normalnego genu, dzięki czemu można określić efekty małych i subtelnych mutacji. (B) Normalny gen można całkowicie zinaktywować, na przykład przez dokonanie w nim dużej delecji; gen — jak się określa — zostaje znokautowany. Ten rodzaj zmian szeroko stosuje się, aby uzyskać informację o możliwej funkcji normalnego genu w całym organizmie zwierzęcym. (C) Do genomu można po prostu dodać zmutowany gen. W niektórych organizmach jest to zmiana genetyczna najłatwiejsza do wprowadzenia. Nawet tak prosta zmiana może jednak dostarczyć ważnych informacji, szczególnie gdy wprowadzony zmutowany gen zdominuje funkcjonowanie genu normalnego

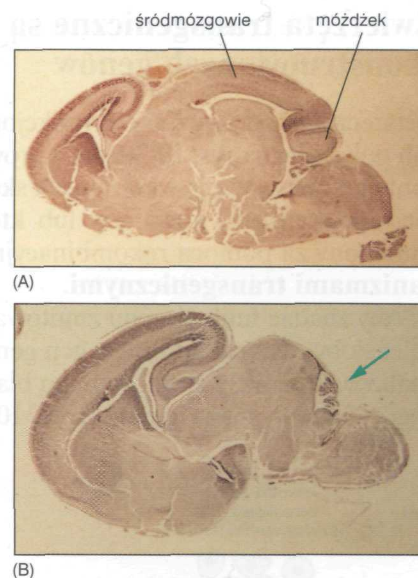
Zwierzęta transgeniczne są nosicielami sztucznie skonstruowanych genów

Ostatecznym sprawdzianem funkcjonowania genu zmutowanego w sposób pokazany na rys. 10-30 jest wprowadzenie go do genomu jakiegoś organizmu i obserwacja wywołanych skutków. Organizmy, do których genomu wprowadzono nowy gen lub których genom został w inny sposób zmieniony za pomocą rekombinacyjnej technologii DNA, nazywamy **organizmami transgenicznymi**.

Aby zbadać funkcje genu zmutowanego *in vitro*, w idealnym przypadku należałoby zastąpić normalny gen genem zmutowanym, tak by można było analizować funkcje zmutowanego białka pod nieobecność białka normalnego. Taka wymiana genów (rys. 10-31A) może łatwo dojść do skutku



Rys. 10-32. Zarys procedur stosowanych do zastępowania genów u myszy. W pierwszym etapie (A) zmieniona wersja genu zostaje wprowadzona do pierwotnych komórek zarodkowych ES (ang. embryonic stem) hodowanych *in vitro*. W niewielkiej ilości komórek ES na drodze rekombinacji homologicznej dochodzi do zastąpienia odpowiednich normalnych genów genami zmienionymi (patrz rys. 9-13A). Te rzadko występujące komórki można zidentyfikować (chociaż często jest to bardzo pracochłonne) i hodować w celu uzyskania wielu komórek potomnych, z których każda nosi jeden zmieniony gen obok jednego normalnego. W następnym etapie procedury (B) zmodyfikowane komórki ES wstrzykuje się do bardzo wczesnego zarodka myszy. Komórki te ulegają włączeniu do rosnącego zarodka, a powstająca z niego mysz zawiera niektóre komórki somatyczne ze zmienionym genem (zaznaczone kolorem *pomarańczowym*). Niektóre spośród takich myszy zawierają także komórki szlaku płciowego ze zmienionym genem. Po skojarzeniu z normalną myszą niektóre spośród potomstwa takiej pary myszy będą miały zmieniony gen we wszystkich komórkach. Jeśli z kolei skojarzy się ze sobą dwie takie myszy, to niektóre myszy potomne we wszystkich swych komórkach będą miały dwa zmienione geny (po jednym w każdym chromosomie). Jeśli zmiana dokonana w wyjściowym genie całkowicie znosi funkcje tego genu, to takie myszy są określane jako „myszy znokautowane". Często się zdarza, że mysz, której braknie genów aktywnych podczas rozwoju, umiera na długo przed osiągnięciem dojrzałości (patrz rys. 10-33)



Rys. 10-33. Transgeniczna mysz, w której obydwie kopie genu kodującego rozwojowo ważny czynnik wzrostu *wnt-1* zostały trwale inaktywowane (znokautowane) w drodze rekombinacji homologicznej. (A) Zarodek normalny; (B) zarodek zmutowany. Zmutowany zarodek nie zawiera móżdżku (*strzałka*) oraz większości śródmózgowia i umiera *in utero* (w macicy). Eksperyment ten wskazuje, że gen *wnt-1*, należący do rodziny genów ważnych dla rozwoju wielu różnych organizmów, jest potrzebny do utworzenia się móżdżku podczas wczesnych etapów rozwoju ssaków. (Fotografie dzięki uprzejmości: Mario Capecchi)

w drodze rekombinacji homologicznej między wprowadzonym zmutowanym DNA a DNA chromosomowym w niektórych prostych organizmach haploidalnych, takich jak bakterie lub drożdże (patrz rys. 9-13A). Rekombinacja homologiczna normalnego genu z wprowadzonym DNA, który zawiera delecję w tym genie, może prowadzić do powstania dużej delecji w normalnym genie i do kompletnej jego inaktywacji, czyli do *nokautu* normalnego genu (rys. 10-31B). Jeszcze inna możliwość polega na dołączeniu zmutowanego genu do genomu gospodarza, bez jakichkolwiek zmian w normalnym genie podczas tego procesu (rys. 10-31C).

Znacznie trudniejsza, ale możliwa, jest wymiana genów w organizmach diploidalnych, takich jak mysz, zawierających duże i złożone genomy (rys. 10-32). Jeśli zmieniony gen uda się wprowadzić do komórek, z których utworzy się przynajmniej część komórek linii płciowej, to powstałe z nich zwierzęta transgeniczne mogą przekazać taki gen przynajmniej niektórym swoim potomkom jako stały element ich genomu. Od strony technicznej jest to możliwe także w odniesieniu do ludzkich komórek linii płciowej, chociaż jest to nielegalne, nawet dla celów terapeutycznych, ze względu na nieprzewidywalne odchylenia, które mogłyby wystąpić u takich osobników. Opracowuje się podobne techniki, za pomocą których można by dokonywać korekty wad genetycznych w somatycznych komórkach człowieka, a więc przeznaczone do somatycznej terapii genowej. Na przykład niektóre choroby genetyczne można by złagodzić przez wprowadzenie genetycznie skorygowanych komórek somatycznych do tkanek najsilniej dotkniętych chorobą. Jednak zmiany te nie mogłyby być przekazywane potomstwu.

Zastępując normalny gen jego wersją delecyjną (lub nieaktywną z jakichś innych powodów, rys. 10-31B) można uzyskać organizmy, w których całkowicie brak produktów kodowanych przez ten gen. Na przykład uzyskano wiele linii myszy ze *znokautowanymi genami*, w których pewne geny zostały trwale inaktywowane. Badania takich myszy doprowadziły ostatnio do dużego postępu w określeniu roli tych genów w złożonym procesie rozwoju ssaków (rys. 10-33).

Streszczenie

- Rekombinacyjna technologia DNA zrewolucjonizowała badania komórek, umożliwiając wybranie dowolnego genu spośród tysięcy genów zawartych w komórce i dokładne określenie jego struktury (po powieleniu — amplifikacji genu).
- Istotnym elementem tej technologii jest możliwość rozcinania długich cząsteczek DNA na specyficzne zestawy fragmentów za pomocą nukleaz restrykcyjnych, z których każda rozcina dwuniciową helisę DNA tylko w miejscu występowania określonych krótkich sekwencji nukleotydowych.
- Fragmenty DNA można rozdzielać na podstawie ich wielkości za pomocą elektroforezy żelowej.
- Są już dostępne techniki pozwalające szybko określać sekwencje nukleotydowe izolowanych fragmentów DNA.

- Obecnie poznano już sekwencję nukleotydową genomów kilku organizmów jednokomórkowych (w tym kilku bakterii i drożdży). Należy się spodziewać, że w ciągu najbliższej dekady zostaną poznane genomy bardziej skomplikowanych organizmów (pewnego nicienia, muszki owocowej, kilku roślin, a nawet człowieka).
- Za pomocą technik hybrydyzacyjnych można w mieszaninie kwasów nukleinowych wykryć dowolną sekwencję fragmentów DNA lub RNA. Techniki te polegają na zdolności pojedynczych nici DNA lub RNA do tworzenia dwuniciowych helis tylko z łańcuchami o komplementarnej sekwencji nukleotydów.
- Jako sondy w reakcjach hybrydyzacji stosuje się jednoniciowe DNA o znanych sekwencjach, znakowane barwnikami fluorescencyjnymi lub radioizotopami. Hybrydyzację kwasów nukleinowych można wykorzystać do określenia lokalizacji genu w chromosomie lub RNA w komórce albo w tkance.
- Metodami chemicznymi (bez użycia enzymów) w laboratoriach można syntetyzować łańcuchy DNA o długości do 120 nukleotydów.
- Za pomocą klonowania spośród milionów rozmaitych cząsteczek DNA można wyselekcjonować DNA o określonej sekwencji i powielić go w czystej postaci w dowolnej ilości.
- Stosując ligazę DNA możemy *in vitro* kowalencyjnie łączyć ze sobą fragmenty DNA, uzyskując cząsteczki DNA nie występujące w warunkach naturalnych.
- Pierwszym etapem typowej procedury klonowania jest wprowadzenie fragmentu DNA, który zamierzamy klonować, do cząsteczki DNA zdolnej do replikacji, takiej jak plazmid lub genom wirusa. Zrekombinowaną cząsteczkę DNA wprowadza się następnie do komórek ulegających szybkim podziałom, zwykle bakterii, tak by wprowadzony DNA ulegał replikacji podczas każdego podziału komórkowego.
- Kolekcję klonowanych fragmentów chromosomowego DNA, stanowiących kompletny genom jakiegoś organizmu, nazywamy biblioteką genomową. Bibliotekę taką często utrzymuje się w bakteriach. Każdy z klonów zawiera inny fragment genomu.
- Klonowane kopie (w formie DNA) wszystkich mRNA określonego typu komórek lub tkanek nazywa się bibliotekami cDNA. Inaczej niż w przypadku klonów genomowych, klonowane cDNA zawierają tylko sekwencje kodujące białka. Nie ma w nich intronów, sekwencji regulatorowych ani promotorów. Są najbardziej przydatne do tego, by doprowadzić do ekspresji genu na poziomie białka.
- Łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR) jest potężnym sposobem amplifikacji DNA przeprowadzanej *in vitro* z użyciem polimerazy DNA. PCR wymaga wstępnej znajomości sekwencji oskrzydlających fragment DNA przeznaczony do powielenia. Konieczne są dwa startery, komplementarne do sekwencji oskrzydlających powielany fragment.
- Klonowane geny można w sposób trwały wprowadzić do genomu komórki lub organizmu za pomocą odpowiednich technik inżynierii genetycznej. Klonowany DNA można zmienić *in vitro*, tworząc na zamówienie gen zmutowany, który wprowadza się na powrót do organizmu, aby określić funkcję danego genu.
- Inżynieria genetyczna ma dalekosiężne konsekwencje. Bakterie, drożdże i komórki ssaków można tak zmienić genetycznie, by syntetyzowały duże ilości określonego białka z dowolnego organizmu. Pozwala to badać białka, które w naturalnych warunkach występują w znikomych ilościach lub których izolowanie jest trudne z innych powodów.

Hasła

biblioteka DNA	klonowanie DNA	mapa restrykcyjna	organizm transgeniczny
cDNA	ligaza DNA	mutageneza ukierunkowana	plazmid rekombinacyjny
hybrydyzacja DNA	łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR)	nukleaza restrykcyjna	technologia DNA
hybrydyzacja *in situ*			

Pytania

Pytanie 10-8. Które z poniższych twierdzeń są prawdziwe? Uzasadnij odpowiedź.

A. Nukleazy restrykcyjne rozcinają DNA w specyficznych miejscach, zawsze ulokowanych pomiędzy genami.

B. Podczas elektroforezy DNA migruje w kierunku elektrody dodatniej.

C. Klony izolowane z bibliotek cDNA zawierają sekwencje promotorowe.

D. Do PCR wykorzystuje się termostabilną polimerazę DNA, ponieważ w każdej rundzie amplifikacji dwuniciowy DNA musi ulec termicznej denaturacji.

E. Trawienie genomowego DNA za pomocą Alu I, enzymu restrykcyjnego rozpoznającego czteronukleotydową sekwencję, daje fragmenty o jednakowej długości 256 nukleotydów.

F. Aby przygotować bibliotekę cDNA, należy użyć polimerazy DNA i odwrotnej transkryptazy.

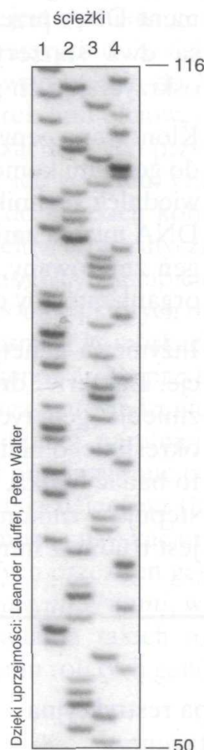
G. Możliwość uzyskiwania „odcisków DNA" za pomocą PCR polega na fakcie, że poszczególne osoby zawierają różną liczbę powtórzeń w rejonach VNTR (patrz rys. 10-25) ich genomów.

H. Jest możliwe, by rejon kodujący jakiegoś genu znajdował się w bibliotece genomowej uzyskanej z określonej tkanki, ale nie znajdował się w bibliotece cDNA przygotowanej z tej samej tkanki.

Pytanie 10-9

A. Określ sekwencję DNA użytego w reakcji pokazanej na rys. P10-9. Cztery ścieżki produktów uzyskano w reakcjach prowadzonych w obecności ddG (ścieżka 1), ddA (ścieżka 2), ddT (ścieżka 3) i ddC (ścieżka 4). Liczby po prawej stronie autoradiogramu zaznaczają położenie fragmentów DNA o długości 50 i 116 nukleotydów.

B. DNA poddany sekwencjonowaniu pochodził ze środkowej części klonu cDNA kodującego białko ssaka. Jaka jest sekwencja aminokwasowa tej części białka?



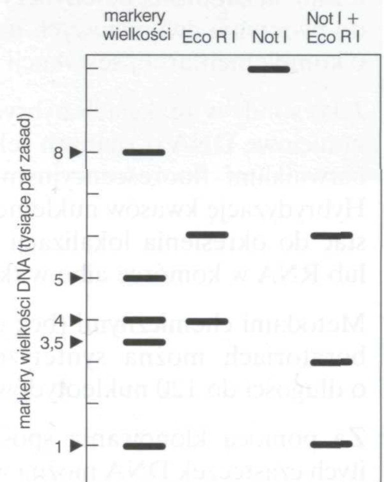
Rys. P10-9

Pytanie 10-10

A. Ilu różnych fragmentów DNA oczekiwałbyś rozcinając genomowy DNA człowieka restryktazą Hae III? (Przypominamy, że w haploidalnym genomie człowieka znajduje się $3 \cdot 10^9$ par nukleotydów). Ile fragmentów powstałoby po użyciu Eco RI lub Not I?

B. Biblioteki genomowe człowieka często są przygotowywane po rozcięciu DNA za pomocą restryktazy Hae III w taki sposób, że DNA jest tylko częściowo strawiony, tzn. nie wszystkie możliwe miejsca Hae III zostały rozcięte. Jaki jest powód takiego postępowania?

Pytanie 10-11. Cząsteczkę dwuniciowego DNA poddano trawieniu przez trzy różne nukleazy restrykcyjne, a otrzymane produkty rozdzielono elektroforetycznie (rys. P10-11). Na tym samym żelu poddano elektroforezie fragmenty DNA o znanej wielkości, które służyły jako markery wielkości fragmentów restrykcyjnych. Wielkość markerów jest podana w tysiącach par zasad (kpz, ang. kb; 1 kpz = 1000 par zasad). Oszacuj wielkość otrzymanych fragmentów restrykcyjnych, kierując się wielkością markerów. Na podstawie tych informacji wydedukuj mapę restrykcyjną wyjściowej cząsteczki DNA, wskazującą względne położenia wszystkich miejsc restrykcyjnych.



Rys. P10-11

Pytanie 10-12. Wprowadzona *in vitro* mutacja przedstawiona na rys. 10-30C powoduje brak tworzenia się w określonym miejscu komplementarnej pary nukleotydów. Czy taki błąd byłby rozpoznany i usunięty przez enzymy naprawcze DNA (patrz rys. 6-26) po wprowadzeniu do komórki plazmidu zawierającego ten błąd? Uzasadnij odpowiedź.

Pytanie 10-13. Wyizolowałeś małą ilość białka występującego w komórkach w bardzo małym stężeniu. Za pomocą proteaz pociąłeś białko na fragmenty, niektóre z nich oczyściłeś chromatograficznie i oznaczyłeś ich sekwencję aminokwasową (w sposób przedstawiony w panelu 5-6, s. 164–165). Jak to się niestety często zdarza w przypadkach białek dostępnych tylko w bardzo małych ilościach, można było określić sekwencję aminokwasów tylko w trzech krótkich fragmentach tego białka:

1. Trp-Met-His-His-Lys
2. Leu-Ser-Arg-Leu-Arg
3. Tyr-Phe-Gly-Met-Gln

A. Wykorzystując kod genetyczny (patrz rys. 7-20), zaprojektuj sondy oligonukleotydowe, których można by użyć do wykrycia przez hybrydyzację genu tego białka w bibliotece cDNA. Który z trzech zestawów sond oligonukleotydowych należałoby użyć w pierwszej kolejności? Uzasadnij odpowiedź.

B. Udało ci się również wykazać, że Gln w peptydzie #3 jest aminokwasem C-końcowym w badanym białku. Jak zaprojektowałbyś oligonukleotydowe startery, których moż-

na by użyć do powielenia metodą PCR części genu znajdującej się w bibliotece cDNA?

C. Załóżmy, że po tej (B) amplifikacji PCR uzyskano produkt o długości dokładnie 300 nukleotydów. Po określeniu jego sekwencji nukleotydowej stwierdziłeś występowanie odcinka CTATCACGCTTTAGG w środkowym rejonie produktu powielania. Jakie wnioski możesz wyciągnąć z tych obserwacji?

Pytanie 10-14. Przedyskutuj następujące twierdzenie: „Na podstawie sekwencji nukleotydowej klonu cDNA opierając się na znajomości kodu genetycznego można wydedukować kompletną sekwencję aminokwasową białka. W rezultacie biochemia białek stała się zbyteczna, ponieważ badając białka właściwie nie można się dowiedzieć niczego więcej".

Pytanie 10-15. Załóżmy, że reakcję sekwencjonowania przeprowadzono w sposób pokazany na rys. 10-5, z wyjątkiem tego, że każdy z trifosforanów dideoksyrybonukleozydów jest połączony kowalencyjnie z innego koloru barwnikiem (który nie przeszkadza w jego wbudowywaniu się do łańcucha DNA). Jakie produkty powstałyby, gdybyś połączył mieszaninę wszystkich czterech znakowanych trifosforanów dideoksyrybonukleozydów razem z czterema nieznakowanymi trifosforanami deoksyrybonukleozydów w jednej mieszaninie inkubacyjnej do sekwencjonowania DNA? Jak wyglądałby obraz produktów poddanych elektroforezie w jednej ścieżce w żelu?

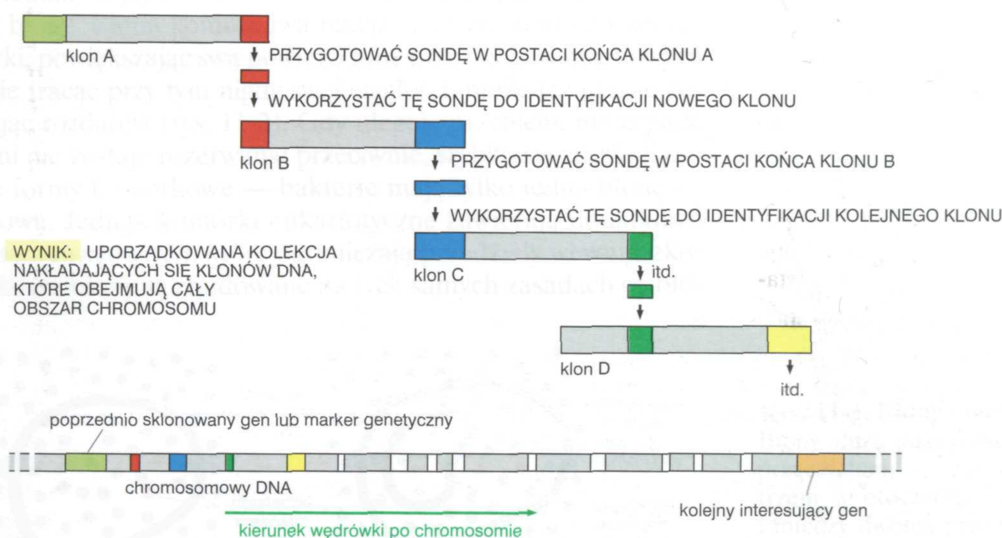
Pytanie 10-16. Jak przedstawiono w odpowiedzi na pytanie 10-10B, genomowe klony DNA są często wykorzystywane do wędrowania wzdłuż chromosomu. W podejściu tym jeden fragment klonowanego DNA jest wykorzystywany do izolowania innych klonów, które zawierają nakładające się sekwencje (rys. P10-16). Stosując tę metodę można ustalić kolejność występowania określonych fragmentów DNA na odcinku DNA o znacznej długości i zidentyfikować nowe geny w bliskim sąsiedztwie genu poprzednio sklonowanego.

A. Czy wędrowanie nie byłoby szybsze, gdyby w metodzie tej wykorzystywano klony cDNA, które nie zawierają sekwencji intronowych?

B. Jakie byłyby konsekwencje napotkania powtarzających się sekwencji DNA, takich jak transpozon L1 (patrz rys. 9-24), który występuje w wielu kopiach i w wielu różnych miejscach genomu?

Pytanie 10-17. Jednym z pierwszych organizmów genetycznie zmienionych z wykorzystaniem metod współczesnej technologii DNA — była bakteria, która normalnie żyje na powierzchni liści truskawek. Bakteria ta wytwarza białko, określane jako białko lodowe, które powoduje tworzenie się wokół niego kryształków lodu, jeśli temperatura spadnie nieco poniżej zera. W wyniku tego truskawki zainfekowane tymi bakteriami są szczególnie podatne na uszkodzenia spowodowane zamarzaniem, gdyż ich komórki ulegają zniszczeniu przez kryształki lodu. Hodowcy truskawek byli oczywiście zainteresowani w przeciwdziałaniu tej sytuacji.

Skonstruowano zmienioną genetycznie wersję bakterii, w których gen białka lodowego został znokautowany. Zmutowane bakterie wprowadzono następnie na dużą ilość pól truskawkowych, gdzie współzawodnicząc z normalnymi bakteriami, wyparły je z tej niszy ekologicznej. Podejście to okazało się sukcesem: truskawki zawierające zmutowane bakterie były mniej podatne na uszkodzenia wywoływane zamarzaniem. Jednak pierwsze doświadczenia polowe wywołały żywe dyskusje, gdyż po raz pierwszy wprowadzono do naturalnego środowiska organizm, który został zmieniony metodami inżynierii genetycznej. Wszystkie wstępne doświadczenia przeprowadzano z wielką ostrożnością i w ścisłej izolacji. Zamieszczona obok fotografia daje pewne wyobrażenie o środkach ostrożności podjętych podczas pierwszego wprowadzania bakterii na poletko z truskawkami (rys. P10-17).



Rys. P10-16

Przeprowadź dyskusję niektórych zagadnień wynikających z tego rodzaju zastosowań technologii DNA. Czy przypuszczasz, że bakterie pozbawione białka lodowego można by wyizolować bez korzystania z technologii DNA? Czy jest możliwe, że mutacje tego rodzaju zachodziły już w warunkach naturalnych? Czy wykorzystanie zmutowanych szczepów bakteryjnych, ale izolowanych ze źródeł naturalnych, powinno budzić mniej ewentualnych zastrzeżeń? Czy powinniśmy niepokoić się ryzykiem związanym z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej w rolnictwie, medycynie i technologii? Uzasadnij odpowiedzi.



Dzięki uprzejmości: John Bedbrook, DNA Plant Technology Corporation

Rys. P10-17

11
Budowa błon

DWUWARSTWA LIPIDOWA

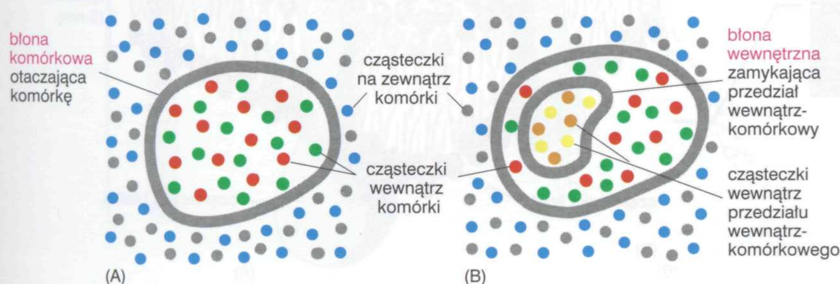
- Lipidy błonowe tworzą w wodzie dwuwarstwy
- Dwuwarstwa lipidowa jest dwuwymiarowym płynem
- Płynność dwuwarstwy lipidowej zależy od jej składu molekularnego
- Dwuwarstwa lipidowa jest asymetryczna
- Asymetria lipidów powstaje wewnątrz komórki
- Dwuwarstwy lipidowe są nieprzepuszczalne dla jonów i substancji rozpuszczonych w wodzie

BIAŁKA BŁONOWE

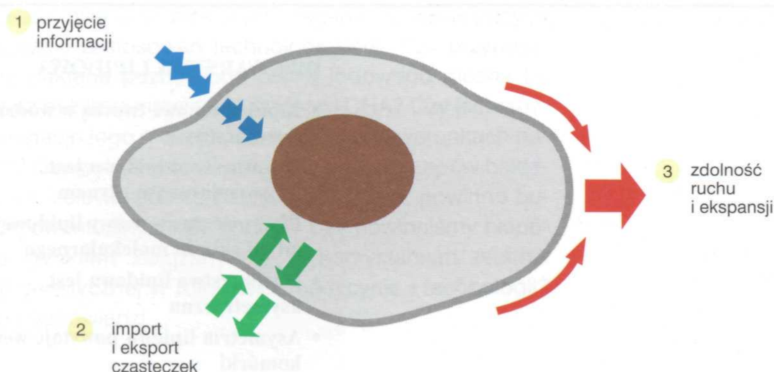
- Białka błonowe są w różny sposób związane z dwuwarstwą lipidową
- Łańcuch polipeptydowy zazwyczaj przechodzi poprzez dwuwarstwę jako α helisa
- Białka błonowe można przeprowadzić w formę rozpuszczalną w detergentach i oczyszczać
- Całkowita struktura jest znana tylko w przypadku bardzo niewielu białek błonowych
- Błona komórkowa jest wzmocniona przez korę komórki
- Powierzchnia komórki jest pokryta cukrowcami
- Komórki mogą ograniczać przemieszczanie się białek błonowych

Żywa komórka jest samoreprodukującym się układem cząsteczek zawartych w obrębie swoistego zbiorniczka, którym jest **błona komórkowa** — warstewka tłuszczowa tak cienka i przezroczysta, że nie można jej bezpośrednio zobaczyć w mikroskopie świetlnym. Prosta konstrukcja tej błony jest oparta na podwójnej warstwie cząsteczek lipidów, a jej grubość wynosi ok. 5 nm, co odpowiada nawarstwieniu ok. 50 atomów. Jednakże jej właściwości są całkowicie odmienne od właściwości jakiejkolwiek warstwy materiału, z którym mamy do czynienia w życiu codziennym. Aczkolwiek błona komórkowa służy głównie jako bariera chroniąca przed rozproszeniem się zawartości komórki lub mieszaniem się jej z otaczającym środowiskiem (rys. 11-1A), ma ona też wiele innych zadań. Jeśli komórka ma przeżyć i rosnąć, muszą do niej wnikać substancje odżywcze, a opuszczać ją produkty zbędne. Stąd też w błonie znajdują się wysoce selektywne przenośniki, kanały i pompy, utworzone z cząsteczek białka, które umożliwiają importowanie wielu specyficznych substancji, a eksportowanie innych. Dalsze zawarte w błonie cząsteczki białkowe działają jako czujniki, co umożliwia komórce reagowanie na zmiany w jej otoczeniu. Równie godne uwagi są mechaniczne właściwości błony. Błona komórkowa nadąża za wzrostem i zmianami kształtu komórki, powiększając swą powierzchnię przez dodawanie nowych fragmentów, nie tracąc przy tym nigdy swej ciągłości; może też ulegać deformacji unikając rozdarcia (rys. 11-2). Gdy ulegnie przebiciu, nie zapada się jak balon ani nie zostaje rozerwana; przeciwnie, szybko się zasklepia.

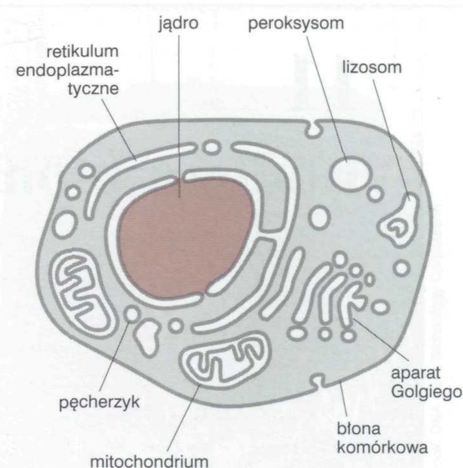
Najprostsze formy komórkowe — bakterie mają tylko jedną błonę — błonę komórkową. Jednak komórki eukariotyczne zawierają dodatkowo wielką ilość *błon wewnętrznych*, które ograniczają przedziały wewnątrzkomórkowe. Te dalsze błony są zbudowane na tych samych zasadach co bło-



Rys. 11-1. Błony komórki jako bariery. Błony służą jako bariery między dwoma przedziałami — zarówno między wnętrzem a otoczeniem komórki (A), jak i między dwoma przedziałami wewnątrzkomórkowymi (B). W obu przypadkach błona zapobiega mieszaniu się cząsteczek jednego przedziału z drugim



Rys. 11-2. Niektóre funkcje błony komórkowej



Rys. 11-3. Błony tworzą w komórce eukariotycznej wiele różnych przedziałów. Pokazano tu otoczone błonami organelle typowej komórki zwierzęcej. Jądro i mitochondria są otoczone dwiema błonami

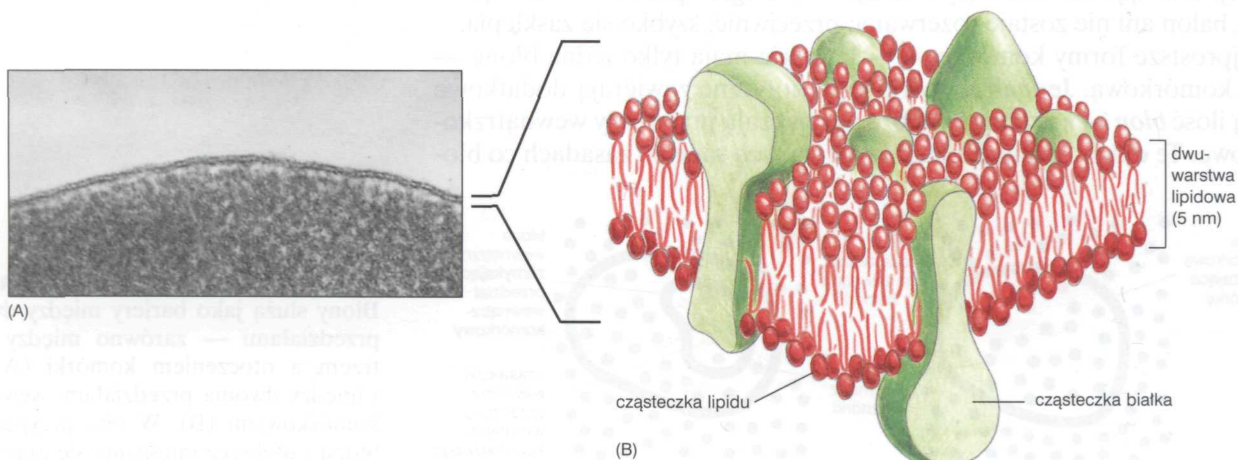
na komórkowa i podobnie jak ta ostatnia również służą jako selektywne bariery pomiędzy przestrzeniami zawierającymi odrębne zbiory cząsteczek (rys. 11-1B). Tak więc błony retikulum endoplazmatycznego, aparatu Golgiego, mitochondriów i innych organelli błonowych (rys. 11-3) umożliwiają utrzymanie pomiędzy tymi organellami charakterystycznych różnic w składzie i funkcji. Również te wewnętrzne błony są nie tylko barierami, ale pełnią też inne funkcje: właśnie subtelne różnice między tymi błonami, zwłaszcza dotyczące składu ich białek błonowych, nadają każdej organelli odrębny charakter.

Wszystkie błony w komórce są zbudowane z lipidów oraz białek i mają wspólny plan budowy ogólnej (rys. 11-4). Komponent lipidowy stanowią miliony cząsteczek lipidów ułożonych w dwie ściśle do siebie przylegające, przeciwstawnie zorientowane warstwy tworzące *dwuwarstwę lipidową* (patrz rys. 11-4B). Dwuwarstwa lipidowa stanowi istotę struktury błony i działa jako bariera przepuszczalności. Cząsteczki białka umożliwiają pozostałe funkcje błony i nadają różnym błonom ich indywidualne właściwości. W tym rozdziale omówimy najpierw lipidy błonowe — a potem białka błonowe.

Dwuwarstwa lipidowa

Struktura **dwuwarstwy lipidowej** została powszechnie uznana za uniwersalną podstawę budowy błon komórki. Jej właściwości są odpowiedzialne za właściwości wspólne dla wszystkich typów błon w komórce. Rozpoczniemy ten podrozdział od zastanowienia się, w jaki sposób struk-

Rys. 11-4. Dwa obrazy błony. (A) Mikrografia elektronowa błony komórkowej (erytrocytu ludzkiego) oglądanej w przekroju poprzecznym. (B) Schematyczny rysunek ukazujący trójwymiarową strukturę błony. (A — dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)



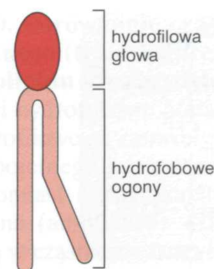
tura dwuwarstwy jest konsekwencją zachowania się cząsteczek lipidów błonowych w środowisku wodnym.

Lipidy błonowe tworzą w wodzie dwuwarstwy

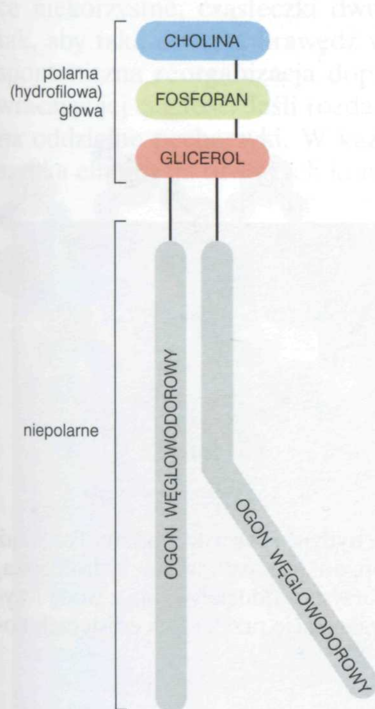
Lipidy błonowe łączą w pojedynczej cząsteczce dwie bardzo różne właściwości: mają hydrofilową („lubiącą wodę") *głowę* i jeden lub dwa hydrofobowe („nienawidzące wody") *ogony węglowodorowe* (rys. 11-5). Najliczniej występującymi lipidami błonowymi są **fosfolipidy**, w których hydrofilowa grupa głowy jest powiązana z resztą cząsteczki przez grupę fosforanową. Fosfolipidem najczęściej występującym w większości błon komórki jest **fosfatydylocholina**, w której hydrofilową głową jest mała cząsteczka choliny złączona z fosforanem, a ogonami hydrofobowymi — dwa długie łańcuchy węglowodorowe (rys. 11-6).

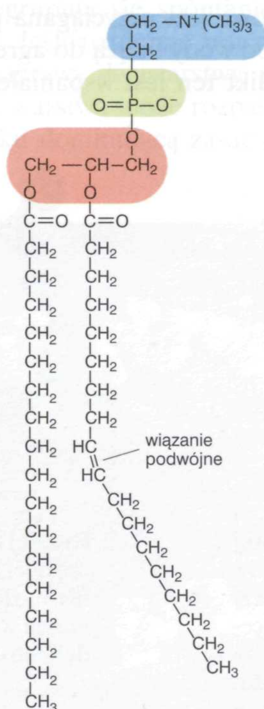
Cząsteczki o właściwościach zarówno hydrofilowych, jak i hydrofobowych określa się jako **amfipatyczne**. Tę cechę mają również inne typy lipidów błonowych — *sterole* (takie jak cholesterol w błonach zwierzęcych) i *glikolipidy*, których hydrofilową głowę stanowią cukry (rys. 11-7). Amfipatyczność odgrywa kluczowa rolę w organizowaniu cząsteczek lipidów w dwuwarstwy.

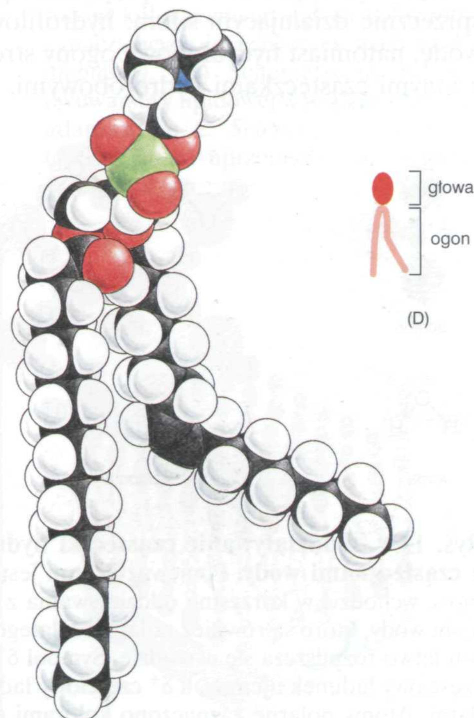
Jak omówiono to w rozdz. 2, cząsteczki hydrofilowe rozpuszczają się łatwo w wodzie, ponieważ zawierają naładowane atomy lub grupy polarne (to jest grupy o nierównomiernie rozmieszczonych dodatnich i ujemnych ładunkach), mogące tworzyć wiązania elektrostatyczne lub wiązania wodorowe z cząsteczkami wody, które same są cząsteczkami polarnymi (rys. 11-8). Natomiast cząsteczki hydrofobowe są w wodzie nierozpuszczalne, ponieważ ich wszystkie lub prawie wszystkie atomy są nie naładowane i niepolarne i dlatego nie mogą tworzyć wiązań z cząsteczkami wody. Zamiast tego atomy te zmuszają przylegające cząsteczki wody do zreorganizowania się wokół cząsteczki hydrofobowej w strukturę podobną



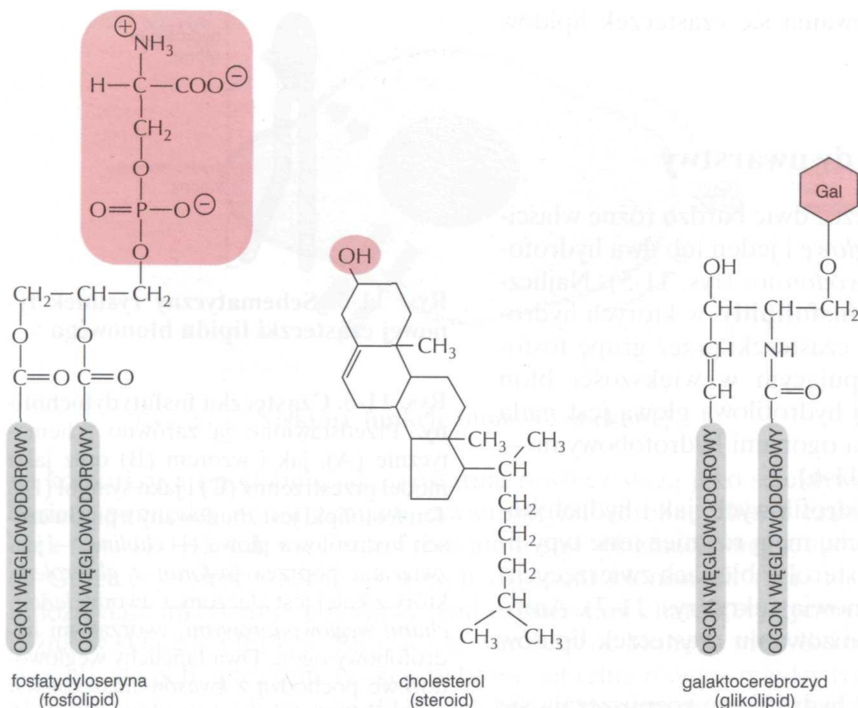
Rys. 11-5. Schematyczny rysunek typowej cząsteczki lipidu błonowego







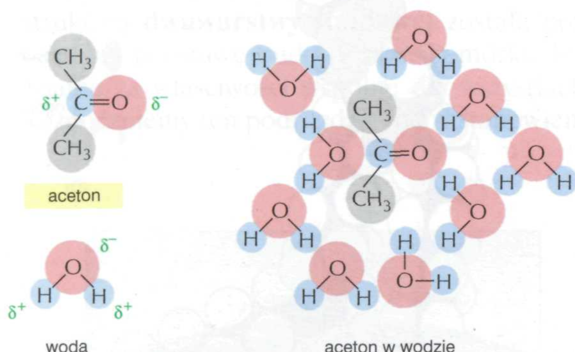
Rys. 11-6. Cząsteczka fosfatydylocholiny. Przedstawiono ją zarówno schematycznie (A), jak i wzorem (B) oraz jako model przestrzenny (C) i jako symbol (D). Ten fosfolipid jest zbudowany z pięciu części: hydrofilowa głowa — *cholina* — jest związana poprzez *fosforan* z *glicerolem*, który z kolei jest złączony z dwoma *łańcuchami węglowodorowymi*, tworzącymi hydrofobowy ogon. Dwa łańcuchy węglowodorowe pochodzą z *kwasów tłuszczowych* — to jest łańcuchów węglowodorowych zakończonych grupą —COOH, łączących się z glicerolem właśnie tą grupą. Zgięcie jednego z łańcuchów węglowodorowych występuje w miejscu, gdzie między dwoma atomami węgla znajduje się podwójne wiązanie; zostało ono tu narysowane celowo przesadnie. Trzon — *fosfatydyl* — w nazwie fosfolipidu dotyczy tej części cząsteczki, która jest zbudowana z fosforanu, glicerolu i kwasów tłuszczowych



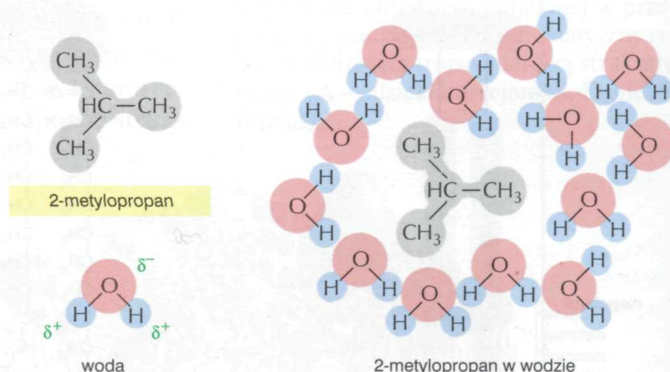
Rys. 11-7. Trzy typy cząsteczek lipidów błonowych. Wszystkie są amfipatyczne, o hydrofilowej głowie i jednym lub dwóch ogonach hydrofobowych. Hydrofilową głową (na tle *różowym*) jest w fosfatydyloserynie fosforan seryny; w cholesterolu — grupa —OH; a w galaktocerebrozydzie — cukier (galaktoza). Patrz również panel 2-4, s. 58–59

do klatki (rys. 11-9). Ponieważ struktura klatki jest bardziej uporządkowana niż struktura otaczającej wody, jej powstanie wymaga dostarczenia energii. Ten wydatek energii zostanie jednak zminimalizowany, gdy cząsteczki hydrofobowe zgrupują się razem, przez co wymuszonej strukturze podporządkuje się najmniejsza możliwa liczba cząsteczek wody. Dlatego też cząsteczki całkowicie hydrofobowe, takie jak tłuszcze w tłuszczowych komórkach zwierząt i oleje w nasionach roślin (rys. 11-10), wkrótce po rozproszeniu w wodzie skupiają się w pojedynczą wielką kroplę.

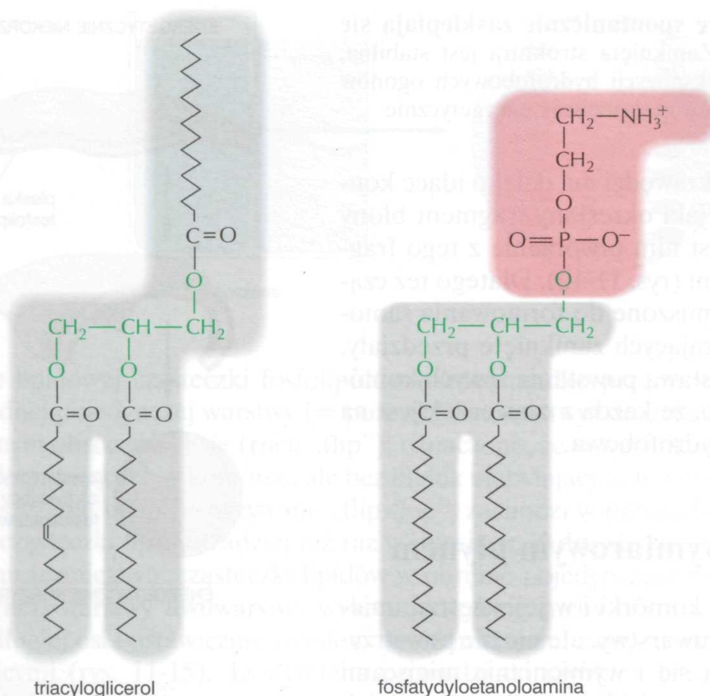
Tak więc cząsteczki amfipatyczne, np. fosfolipidy, są poddane dwóm sprzecznie działającym siłom: hydrofilowa głowa jest przyciągana przez wodę, natomiast hydrofobowe ogony stronią od wody i dążą do agregacji z innymi cząsteczkami hydrofobowymi. Konflikt ten jest wspaniale roz-



Rys. 11-8. Oddziaływanie cząsteczki hydrofilowej z cząsteczkami wody. Ponieważ aceton jest polarny, może wchodzić w korzystne oddziaływania z cząsteczkami wody, które są również polarne. Dlatego też aceton łatwo rozpuszcza się w wodzie. Symbol δ⁻ oznacza częściowy ładunek ujemny, a δ⁺ częściowy ładunek dodatni. Atomy polarne zaznaczono kolorami (*różowym* i *niebieskim*), a grupy niepolarne przedstawiono jako *szare*



Rys. 11-9. Cząsteczka hydrofobowa w wodzie. Ponieważ cząsteczka 2-metylopropanu jest całkowicie hydrofobowa, nie może wchodzić w korzystne oddziaływania z wodą i wymusza wokół siebie reorganizację przylegających cząsteczek wody w strukturę typu klatki

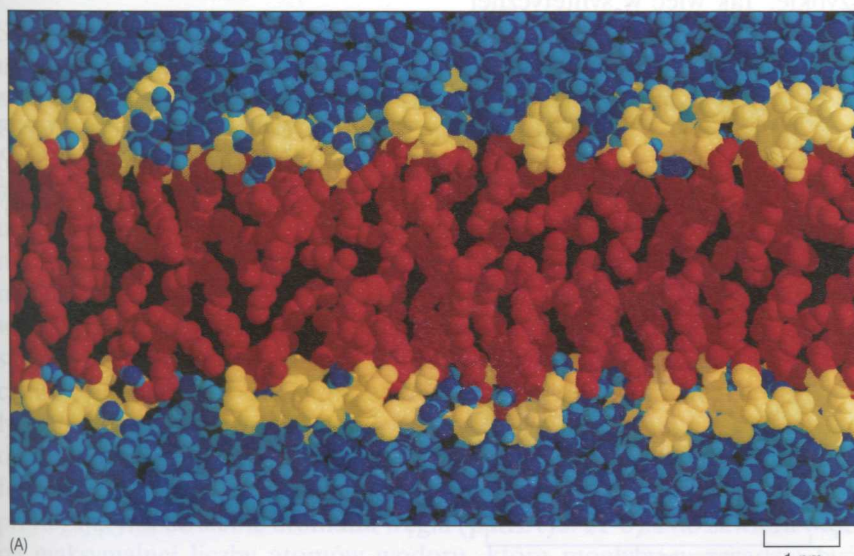


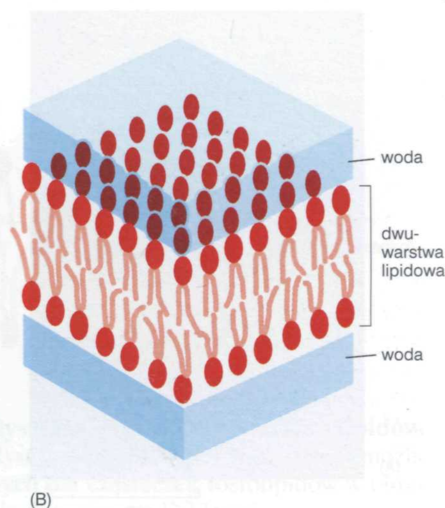
Rys. 11-10. Porównanie cząsteczki tłuszczu obojętnego (triacyloglicerol) z cząsteczką fosfolipidu (fosfatydyloetanoloamina). Części hydrofobowe podano na tle *szarym*, a hydrofilowe na *czerwonym*. Cząsteczka tłuszczu obojętnego jest całkowicie hydrofobowa, natomiast cząsteczka fosfolipidu jest amfipatyczna (amfifilowa). (Trzeci hydrofobowy ogon w cząsteczce triacyloglicerolu narysowano tu — dla porównania z fosfolipidem — ku górze, aczkolwiek zwykle przedstawia się go jako skierowany ku dołowi, równolegle do pozostałych węglowodorów)

wiązany przez tworzenie dwuwarstwy lipidowej — formy uporządkowania satysfakcjonującej obie strony i najbardziej korzystnej energetycznie. Hydrofilowe głowy są zwrócone ku wodzie po obu stronach dwuwarstwy; hydrofobowe ogony są osłonięte przed wodą i leżą tuż przy sobie we wnętrzu dwuwarstwy (rys. 11-11).

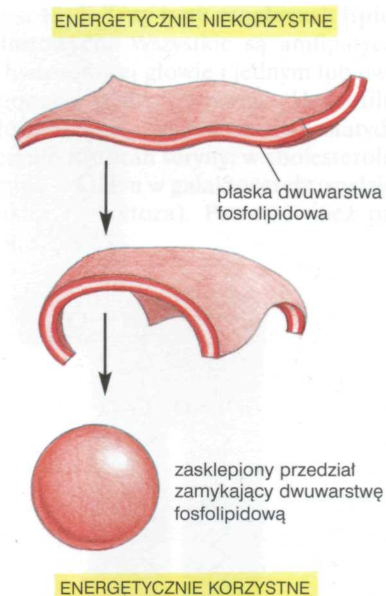
Te same siły, które powodują formowanie się amfipatycznych cząsteczek w dwuwarstwę, nadają dwuwarstwie zdolność samozasklepiania się. Jakiekolwiek rozdarcie dwuwarstwy doprowadzi do powstania wolnej krawędzi mającej kontakt z wodą, a ponieważ energetycznie jest to wysoce niekorzystne, cząsteczki dwuwarstwy przegrupują się spontanicznie tak, aby taką otwartą krawędź wyeliminować. Jeśli rozdarcie jest małe, spontaniczna reorganizacja doprowadzi do naprawy dwuwarstwy, przywracając jej ciągłość. Jeśli rozdarcie jest duże, warstwa może rozpaść się na oddzielne pęcherzyki. W każdym przypadku dominującą zasadą jest szybka eliminacja otwartych krawędzi.

Rys. 11-11. Dwuwarstwa fosfolipidowa widziana w przekroju poprzecznym. (A) Uzyskany w drodze symulacji komputerowej obraz cząsteczek fosfolipidów (*ogony* kolor *czerwony* i *głowy* kolor *żółty*) i otaczających je cząsteczek wody (kolor *niebieski*). (B) Schematyczny rysunek dwuwarstwy lipidowej w wodzie. (A — zaadaptowano z: *Science*, 262: 223–228 (1993); dzięki uprzejmości: R. Venable, R. Pastor)





Rys. 11-12. Dwuwarstwy lipidowe spontanicznie zasklepiają się tworząc zamknięte przedziały. Zamknięta struktura jest stabilna, ponieważ pozwala na uniknięcie ekspozycji hydrofobowych ogonów węglowodorowych do wody, co byłoby niekorzystne energetycznie



Niedopuszczalność istnienia otwartych krawędzi ma daleko idące konsekwencje: istnieje tylko jeden sposób, w jaki określony fragment błony może się pozbyć otwartych krawędzi, a jest nim utworzenie z tego fragmentu osłonki wokół zamkniętej przestrzeni (rys. 11-12). Dlatego też cząsteczki amfipatyczne, np. fosfolipidy, są zmuszone do formowania samozasklepiających się zbiorniczków, ograniczających zamknięte przedziały. To uderzające zachowanie się, będące podstawą powstania żywych komórek, jest w istocie po prostu wynikiem tego, że każda z cząsteczek jest na jednym końcu hydrofilowa, a na drugim hydrofobowa.

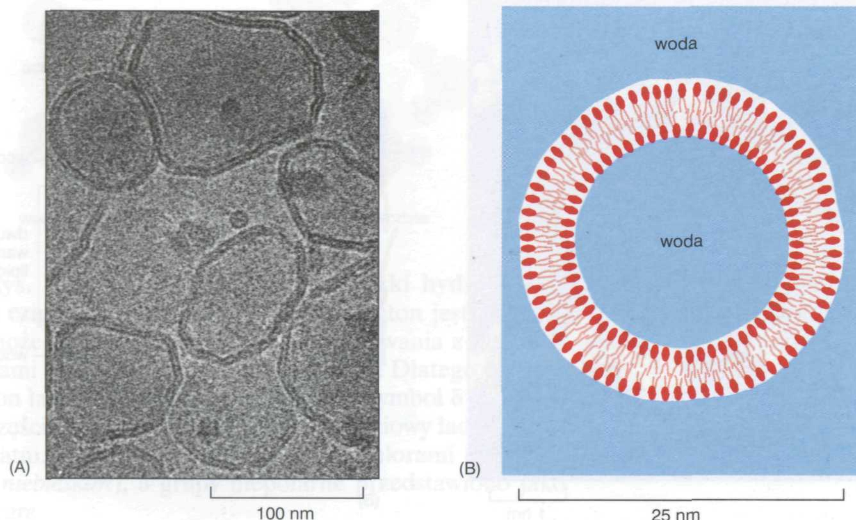
Dwuwarstwa lipidowa jest dwuwymiarowym płynem

Wodne środowisko istniejące na zewnątrz komórki i w jej wnętrzu uniemożliwia ucieczkę lipidów błonowych z dwuwarstwy, ale nic nie powstrzymuje tych cząsteczek od przemieszczania się i wymieniania miejscami w obrębie płaszczyzny dwuwarstwy. Dlatego też błona zachowuje się jak dwuwymiarowy płyn, co ma kluczowe znaczenie dla funkcji błon. Ta właściwość różni się od *giętkości*, przez którą rozumiemy zdolność błony do uginania się. Giętkość jest ważnym czynnikiem umożliwiającym tworzenie pęcherzyków błonowych, ale zarazem narzucającym dolną granicę ich wielkości, którą jest średnica ok. 25 nm.

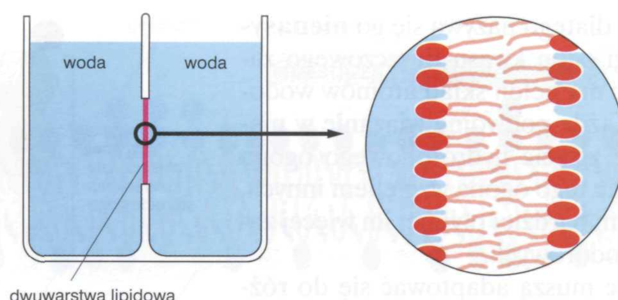
Płynność dwuwarstw lipidowych można badać z użyciem dwuwarstw syntetycznych, które można łatwo otrzymać przez spontaniczną agregację amfipatycznych cząsteczek lipidów w środowisku wodnym. W doświadczeniach używa się głównie dwóch typów syntetycznych (sztucznych) dwuwarstw lipidowych. Zamknięte kuliste pęcherzyki — *liposomy* powstają po dodaniu czystych fosfolipidów do wody; średnica ich sięga w przybliżeniu od 25 nm do 1 mm (rys. 11-13). Drugim typem są płaskie dwuwarstwy fosfolipidowe, które można uformować w otworze przegrody rozdzielającej dwa przedziały wodne (rys. 11-14).

Te proste sztuczne dwuwarstwy umożliwiają subtelne pomiary ruchów cząsteczek lipidów; z pomiarów takich wynika, że pewne typy ruchu występują rzadko, inne natomiast są częste i szybkie. Tak więc w syntetycznej

Pytanie 11-1. Mówi się, że cząsteczki wody „układają się" wokół związków hydrofobowych „w strukturę podobną do klatki" (np. patrz rys. 11-9). Wydaje się to paradoksalne, ponieważ cząsteczki wody nie oddziałują ze związkami hydrofobowymi. Jak mogą więc „wiedzieć" o obecności tych związków i zmienić swe zachowanie tak, aby oddziaływać ze sobą w inny sposób? Ustosunkuj się do tego zastrzeżenia, rozwijając przy tym przejrzystą koncepcję tego, co rozumie się przez strukturę „podobną do klatki". Jak ma się ona do lodu? Dlaczego ta struktura klatki będzie energetycznie niekorzystna?



Rys. 11-13. Liposomy. (A) Mikrografia elektronowa pęcherzyków fosfolipidowych (liposomów), ukazująca dwuwarstwową strukturę błony. (B) Rysunek poprzecznego przekroju kulistego liposomu. (A — dzięki uprzejmości: Jean Lepault)



Rys. 11-14. Widok poprzecznego przekroju sztucznej dwuwarstwy fosfolipidowej. Płaska dwuwarstwa (tzw. czarna błonka) powstaje w małym otworze (o średnicy ok. 1 mm) w ściance dzielącej dwa przedziały wodne. Aby uzyskać taką dwuwarstwę, otwór zanurzony w roztworze wodnym powleka się za pomocą pędzelka roztworem fosfolipidów w rozpuszczalniku niewodnym

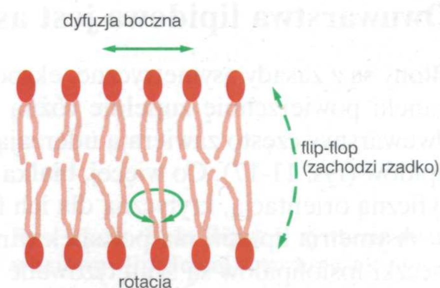
dwuwarstwie lipidowej cząsteczki fosfolipidów bardzo rzadko przemieszczają się z jednej pojedynczej warstwy (= połówki dwuwarstwy) do drugiej z równoczesnym obróceniem się (ruch „flip"); oznaczono, że w warunkach podobnych do panujących w komórce, ale bez białek ułatwiających ten proces, przemieszczenie takie — nazywane „flip-flop", zachodzi w przypadku pojedynczej cząsteczki lipidu rzadziej niż raz w miesiącu. Z drugiej strony, dzięki ruchom termicznym cząsteczki lipidów w obrębie pojedynczej (monomolekularnej) warstwy dwuwarstwy wykonują szybkie ruchy obrotowe wokół swej długiej osi i ustawicznie wymieniają się miejscami z cząsteczkami sąsiadującymi (rys. 11-15). Ta wymiana prowadzi do szybkiej dyfuzji w płaszczyźnie błony tak, iż na przykład w sztucznej dwuwarstwie cząsteczka lipidu może w ciągu jednej sekundy dyfundować na odległość równą wymiarowi dużej komórki bakteryjnej (~2 μm). Przy obniżeniu temperatury spadek energii termicznej zmniejsza szybkość ruchu lipidów, w wyniku czego dwuwarstwa staje się mniej płynna.

Podobne wyniki uzyskuje się dla izolowanych błon komórki i dla całych komórek, co wskazuje, że dwuwarstwa lipidowa w natywnych błonach również zachowuje się jak dwuwymiarowy płyn, w którym budujące ją cząsteczki lipidów mają swobodę ruchu w obrębie swej warstwy w jakimkolwiek kierunku płaszczyzny błony; w komórkach, podobnie jak w dwuwarstwach syntetycznych, poszczególne cząsteczki fosfolipidów pozostają w obrębie pojedynczej warstwy dwuwarstwy lipidowej i nie dokonują spontanicznie przemieszczenia typu flip-flop (patrz rys. 11-15).

Pytanie 11-2. Na twoim roku studiów pięciu studentów siedzi zawsze razem w pierwszym rzędzie. Może tak być dlatego, że (A) rzeczywiście lubią się wzajemnie lub (B) nikt inny nie chce z nimi siedzieć. Która z tych dwóch możliwości jest słuszna przy tworzeniu dwuwarstwy lipidowej? Wyjaśnij to. Przypuśćmy, że cząsteczki lipidów zachowywałyby się stosownie do drugiej możliwości. Jak zmieniłyby się wtedy właściwości dwuwarstwy lipidowej?

Płynność dwuwarstwy lipidowej zależy od jej składu molekularnego

Stopień płynności błony — a więc łatwość, z jaką cząsteczki lipidów przemieszczają się w obrębie płaszczyzny dwuwarstwy — jest czynnikiem istotnym dla funkcji błony i musi być utrzymywany w określonych granicach. Płynność dwuwarstwy lipidowej w danej temperaturze zależy od rodzaju budujących błonę fosfolipidów, a szczególnie od charakteru ich ogonów węglowodorowych: im ściślejsze i bardziej regularne jest upakowanie ogonów, tym bardziej lepka, a mniej płynna będzie dwuwarstwa. Na upakowanie ogonów węglowodorowych w dwuwarstwie mają wpływ dwie ich główne właściwości — długość oraz stopień *nienasycenia* (to jest ilość obecnych w nich wiązań podwójnych). Długość ogonów węglowodorowych w cząsteczkach fosfolipidów sięga od 14 do 24 atomów węgla, przy czym najczęstsza jest liczba 18–20. Krótsze łańcuchy zmniejszają tendencję oddziaływania węglowodorowych ogonów ze sobą i przez to zwiększają płynność dwuwarstwy. Jeden z dwóch węglowodorowych ogonów każdej cząsteczki fosfolipidów ma zazwyczaj jedno lub więcej podwójnych wiązań pomiędzy przylegającymi do siebie atomami węgla (patrz rys. 11-6). Nie zawiera więc on maksymalnej liczby atomów wodoru, które mogłyby w zasadzie być



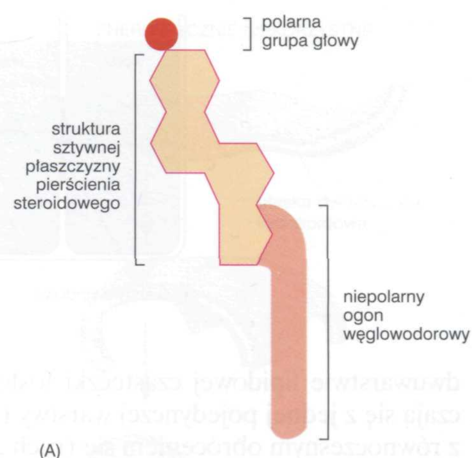
Rys. 11-15. Ruchliwość fosfolipidów. Rysunek wyjaśnia trzy typy ruchów możliwych dla cząsteczek fosfolipidów w obrębie dwuwarstwy lipidowej

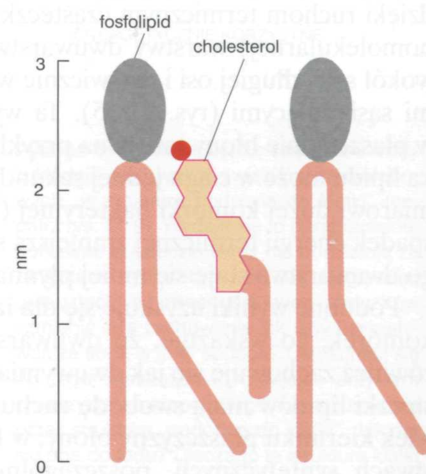
przyłączone do jego szkieletu węglowego i dlatego nazywa się go **nienasyconym** w odniesieniu do wodorów. Drugi ogon kwasu tłuszczowego zazwyczaj nie ma wiązań podwójnych, a więc ma pełen skład atomów wodoru i dlatego jest nazywany **nasyconym**. Każde podwójne wiązanie w nienasyconym węglowodorze wytwarza małe zgięcie hydrofobowego ogona (patrz rys. 11-6), które utrudnia upakowanie tego ogona względem innych. Z tego powodu dwuwarstwy lipidowe są tym bardziej płynne, im więcej zawierają nienasyconych łańcuchów węglowodorowych.

W komórkach bakterii i drożdży, które muszą adaptować się do różnych temperatur, zarówno długości, jak i stopień nienasycenia węglowodorowych ogonów w dwuwarstwie są stale dopasowywane tak, aby utrzymać względnie stały poziom płynności błony: na przykład w wyższych temperaturach komórka wytwarza lipidy błonowe o ogonach dłuższych i zawierających mniej wiązań podwójnych. Metoda podobna do tego rozwiązania jest używana w produkcji margaryny z olejów roślinnych. Tłuszcze wytwarzane przez rośliny są w zasadzie nienasycone i dlatego płynne w temperaturze pokojowej, odmiennie niż tłuszcze zwierzęce, takie jak masło i smalec, które są z reguły nasycone i dlatego w temperaturze pokojowej mają postać stałą. Margaryna jest produkowana z uwodorowanych olejów roślinnych, w których przez dodanie wodoru usunięto podwójne wiązania, przez co oleje te stają się w temperaturze pokojowej bardziej stałe i podobne do masła.

Płynność błony jest dla komórki ważna z wielu względów. Umożliwia szybką dyfuzję białek błonowych w płaszczyźnie dwuwarstwy i ich wzajemne oddziaływanie, tak istotne np. w sygnalizacji komórkowej (omówionej w rozdz. 15). Właśnie dzięki płynności możliwe jest dyfuzyjne rozprowadzanie lipidów i białek błonowych z miejsc, w których są one po swej syntezie wbudowywane w dwuwarstwę, do innych obszarów komórki. Płynność błon umożliwia fuzję błon ze sobą i wymieszanie ich cząsteczek, co przy podziale komórki zapewnia równomierne rozdzielenie tworzących błonę cząsteczek pomiędzy komórki potomne. Trudno sobie wyobrazić, jak komórka mogłaby żyć, rosnąć i reprodukować się, gdyby błony nie były płynne.

W komórkach zwierząt płynność błony jest modulowana przez obecność steroidu, **cholesterolu**, nieobecnego u roślin, drożdży i bakterii. Te krótkie, sztywne cząsteczki występują w szczególnie dużych ilościach w błonie komórkowej, gdzie wypełniają przestrzenie między sąsiadującymi cząsteczkami fosfolipidów, powstałe w wyniku obecności zgięć w nienasyconych węglowodorowych ogonach tych ostatnich (rys. 11-16). W ten sposób cholesterol usztywnia dwuwarstwę, zmniejszając jej płynność i przepuszczalność.



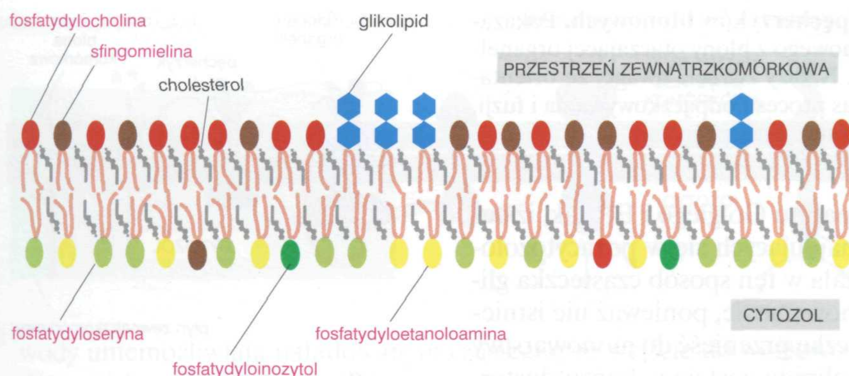


Rys. 11-16. Rola cholesterolu w błonach. (A) Plan budowy cholesterolu. (B) Pokazano, jak pasuje on do przestrzeni między cząsteczkami fosfolipidów w dwuwarstwie lipidowej. Chemiczny wzór cholesterolu podano na rys. 11-7

Dwuwarstwa lipidowa jest asymetryczna

Błony są z zasady asymetryczne, eksponując na zewnątrz komórki lub organelli powierzchnię zupełnie różną niż ku ich wnętrzu. Dwie warstwy dwuwarstwy często zawierają uderzająco różny zbiór fosfolipidów i glikolipidów (rys. 11-17). Co więcej, białka są wtopione w dwuwarstwę ze specyficzną orientacją, krytyczną dla ich funkcji.

Asymetria lipidów ma początek w miejscu ich powstawania. Nowe cząsteczki fosfolipidów są syntetyzowane w komórce przez enzymy błonowe, których substratami są kwasy tłuszczowe dostępne w jednej warstwie dwuwarstwy — inaczej: monowarstwie lub monomolekularnej warstwie lipidowej — i wprowadzają nowo utworzone fosfolipidy do tejże warstwy. Aby błona mogła rosnąć jako całość, odpowiednia część cząsteczek lipidów musi zostać następnie przeniesiona do przeciwstawnej warstwy monomoleku-



Rys. 11-17. Asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów i glikolipidów w lipidowej dwuwarstwie błony komórkowej. Pięć różnych fosfolipidów (oznaczonych *czerwonymi* napisami) pokazano w odmiennych kolorach. Głowy glikolipidów zaznaczono jako *niebieskie sześciokąty*, reprezentujące cukry. Wszystkie cząsteczki glikolipidów są umieszczone w zewnętrznej monowarstwie błony, natomiast cholesterol jest rozmieszczony prawie równomiernie w obu monowarstwach

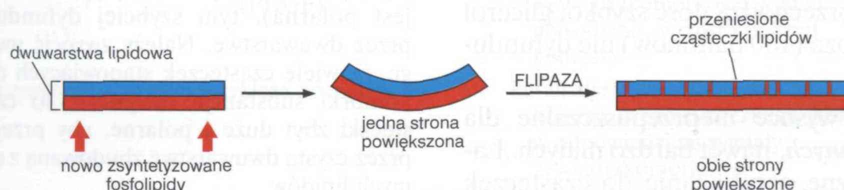
larnej. Przeniesienie to jest katalizowane przez enzymy o nazwie *flipazy* (rys. 11-18). Istnieje pogląd, że flipazy mogą selektywnie przenosić specyficzne cząsteczki fosfolipidów, przez co w obu pojedynczych warstwach dwuwarstwy lipidowej następuje zagęszczanie różnych typów fosfolipidów.

Jednakże wprowadzanie fosfolipidów tylko od jednej strony i działanie selektywnych flipaz nie są jedyną drogą powstawania asymetrii dwuwarstw lipidowych. W szczególności, odmienny mechanizm działa w przypadku glikolipidów, które są klasą cząsteczek lipidowych, wykazującą najbardziej uderzające i niezmienne asymetryczne rozmieszczenie w komórkach zwierząt. Aby wyjaśnić ich rozmieszczenie, musimy przyjrzeć się dokładniej drodze powstawania nowych błon w komórkach eukariotycznych.

Asymetria lipidów powstaje wewnątrz komórki

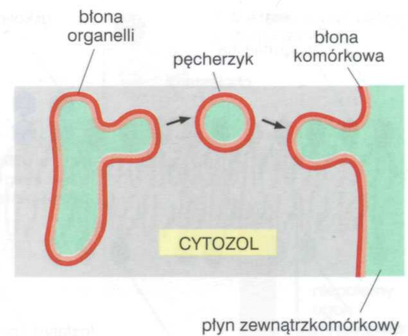
W komórkach eukariotycznych synteza prawie wszystkich nowych błon zachodzi w jednym przedziale wewnątrzkomórkowym — *retikulum endoplazmatycznym*, czyli ER (omówionym bardziej szczegółowo w rozdz. 14). Powstająca, a właściwie rosnąca tam nowa błona jest eksportowana do innych błon komórki przez cykliczne odrywanie się pęcherzyków i ich fuzję: fragmenty błony są odrywane z ER w postaci małych pęcherzyków, które zostają następnie wbudowane w inną błonę w procesie fuzji. Ponieważ podczas takiego transportu pęcherzykowego orientacja dwuwarstwy w stosunku do cytozolu jest zachowana, wszystkie błony w komórce — zarówno błona komórkowa, jak i błony wewnątrzkomórkowe osłaniające organelle — mają dwie wyraźnie różniące się powierzchnie (i, odpowiednio, monowarstwy): „wewnętrzną", czyli *cytozolową*, eksponowaną do cytozolu, oraz „zewnętrzną", czyli *niecytozolową* (pozacytozolową), eksponowaną albo do otoczenia komórki, albo do wewnętrznej przestrzeni organelli (rys. 11-19).

Glikolipidy występują głównie w błonie komórkowej i to tylko w pozacytozolowej warstwie dwuwarstwy. Dlatego też ich grupy cukrowe są eksponowane na zewnątrz komórki (patrz rys. 11-17), gdzie wchodzą w skład ochronnego płaszcza z cukrowców, który otacza większość komórek zwierzęcych. Cząsteczki glikolipidów uzyskują swoje grupy cukrowe w aparacie Golgiego (omówionym w rozdz. 14). Enzymy dodające grupy cukrowe do



Rys. 11-18. Rola flipaz w syntezie dwuwarstwy lipidowej. Aczkolwiek nowo syntetyzowane cząsteczki fosfolipidów są zawsze dodawane po jednej stronie dwuwarstwy, niektóre z nich są przenoszone do przeciwległej monowarstwy przez enzymy — flipazy — tak, iż powiększa się cała dwuwarstwa

Rys. 11-19. **Pączkowanie i fuzja pęcherzyków błonowych.** Pokazano odpączkowanie pęcherzyka błonowego z błony otaczającej organellę i jego fuzję z błoną komórkową. Należy zwrócić uwagę, że orientacja błony zostaje zachowana podczas procesu odpączkowywania i fuzji, przez co powierzchnia cytozolowa zawsze nią pozostaje



lipidów występują wyłącznie we wnętrzu aparatu Golgiego i ER tak, iż cukry są dołączane do cząsteczek lipidów znajdujących się w pozacytozolowej warstwie dwuwarstwy lipidowej. Powstała w ten sposób cząsteczka glikolipidu pozostaje już na zawsze w tej monowarstwie, ponieważ nie istnieją żadne flipazy, które mogłyby taką cząsteczkę przenieść do monowarstwy cytozolowej. Tak więc, gdy cząsteczka glikolipidu zostaje w końcu dostarczona do błony komórkowej, jest odwrócona od cytozolu i wystawia swą grupę cukrową na zewnątrz komórki (patrz rys. 11-19).

Inne cząsteczki lipidów wykazują odmienne typy asymetrycznego rozmieszczenia, związane z innymi funkcjami. Na przykład *fosfolipidy inozytolowe* są mniej licznymi składnikami błony komórkowej, ale odgrywają specjalną rolę w przekazywaniu sygnałów z powierzchni komórki do składników wewnątrzkomórkowych, które na ten sygnał odpowiedzą (co omówiono w rozdz. 15). Działają one tylko wtedy, gdy sygnał zostanie już przeniesiony poprzez błonę komórkową i dlatego są skupione w cytozolowej monowarstwie tej błony (patrz rys. 11-17).

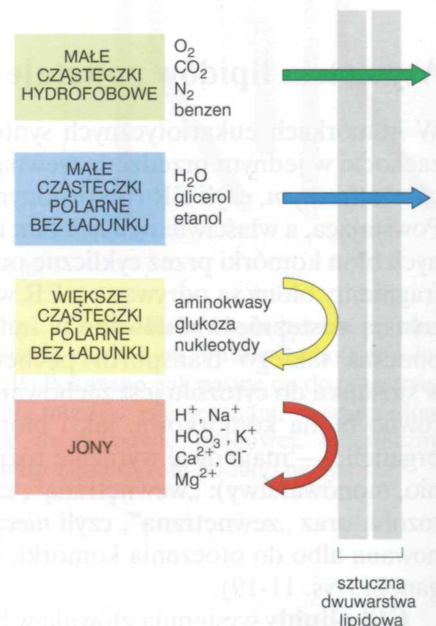
Pytanie 11-3. Wydaje się paradoksalne, że dwuwarstwa lipidowa może być płynna, a jednak asymetryczna. Wyjaśnij to.

Dwuwarstwy lipidowe są nieprzepuszczalne dla jonów i substancji rozpuszczonych w wodzie

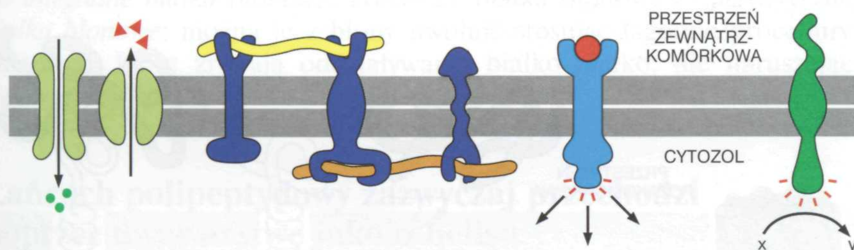
Zobaczyliśmy już, że zasadniczą funkcją każdej błony w komórce jest tworzenie bariery kontrolującej przechodzenie cząsteczek przez błonę. Główną rolę odgrywa przy tym hydrofobowe wnętrze dwuwarstwy lipidowej, ponieważ stanowi ono barierę zapobiegającą przejściu większości cząsteczek hydrofilowych. Cząsteczki te równie niechętnie wchodzą do środowiska tłuszczowego, jak cząsteczki hydrofobowe do wody.

Funkcje dwuwarstwy lipidowej jako bariery można wykazać w dwuwarstwach syntetycznych, typu pokazanego na rys. 11-14. Jeżeli odczeka się dostatecznie długo, przez taką dwuwarstwę przedyfunduje w końcu każda cząsteczka. Jednak *szybkość* takiej dyfuzji różni się niezmiernie w zależności od wielkości cząsteczki i cech jej rozpuszczalności. Ogólnie biorąc, dyfuzja poprzez dwuwarstwę będzie tym szybsza, im cząsteczka jest mniejsza i im łatwiej rozpuszcza się w olejach (tj. im bardziej jest hydrofobowa, czyli niepolarna). Tak więc:

1. *Małe cząsteczki niepolarne*, takie jak molekularny tlen (O_2, masa cząsteczkowa 32 daltony) i dwutlenek węgla (44 daltony), łatwo rozpuszczają się w warstwie lipidowej i dlatego szybko przez nią dyfundują; przepuszczalność dla gazów jest dla komórki bardzo istotna, ponieważ umożliwia ona ważne procesy komórkowe, omówione w rozdz. 13.
2. *Nie naładowane cząsteczki polarne* (cząsteczki o nierównomiernie rozmieszczonym ładunku elektrycznym) również dyfundują szybko poprzez dwuwarstwę, jeśli są dostatecznie małe. Na przykład woda (18 daltonów) i etanol (46 daltonów) przechodzą dość szybko; glicerol (92 daltony) dyfunduje wolniej, a glukoza (180 daltonów) nie dyfunduje prawie wcale (rys. 11-20).
3. Dwuwarstwy lipidowe są natomiast wysoce nieprzepuszczalne dla wszystkich *jonów i cząsteczek naładowanych,* nawet bardzo małych. Ładunek cząsteczek i ich silne elektryczne przyciąganie do cząsteczek



Rys. 11-20. **Względna przepuszczalność sztucznej dwuwarstwy lipidowej dla różnych klas cząsteczek.** Im mniejsza jest cząsteczka i, co ważniejsze, im mniejsza jest liczba jej energetycznie korzystnych interakcji z wodą (tj. im mniej jest polarna), tym szybciej dyfunduje przez dwuwarstwę. Należy zwrócić uwagę, że wiele cząsteczek stanowiących dla komórki substancje odżywcze, to cząsteczki zbyt duże i polarne, aby przejść przez czystą dwuwarstwę zbudowaną z samych lipidów



Rys. 11-21. Niektóre funkcje białek błony komórkowej

wody uniemożliwiają naładowanym cząsteczkom wejście do węglowodorowej fazy dwuwarstwy. Tak więc, sztuczne dwuwarstwy są miliard (10^9) razy bardziej przepuszczalne dla wody, niż dla tak nawet małych jonów jak Na^+ lub K^+.

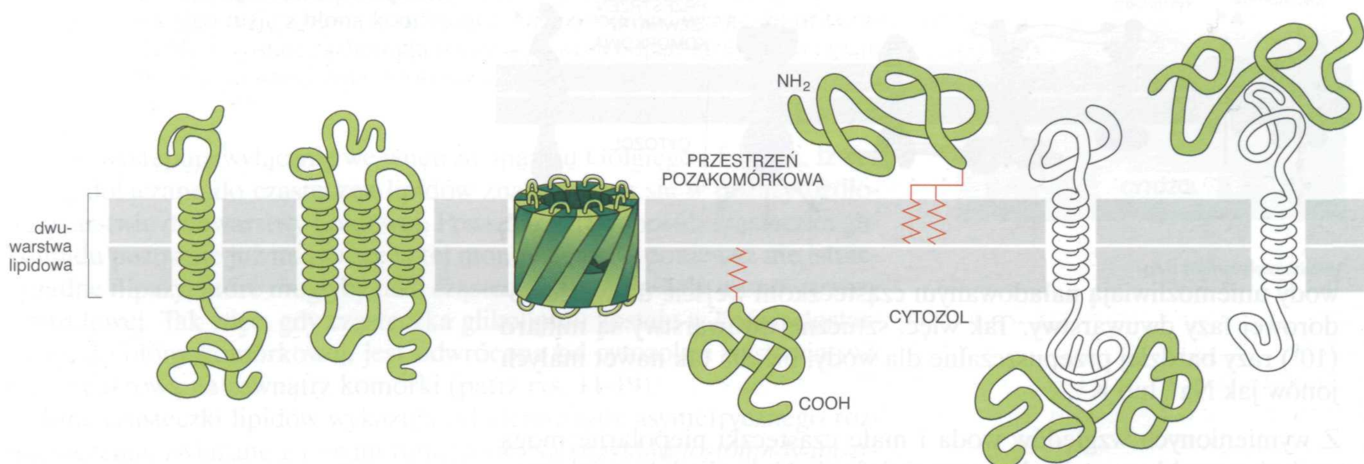
Z wymienionych względów woda i małe cząsteczki niepolarne mogą przenikać przez błony w drodze prostej dyfuzji. Aby jednak komórki mogły pobierać substancje odżywcze i usuwać zbędne produkty, ich błona komórkowa musi umożliwiać przechodzenie wielu innych cząsteczek, takich jak jony, cukry, aminokwasy, nukleotydy i liczne metabolity komórkowe. Ponieważ w drodze prostej dyfuzji cząsteczki te przechodziłyby przez dwuwarstwę lipidową o wiele za wolno, do ich efektywnego przenoszenia poprzez błony w komórce niezbędna jest obecność wyspecjalizowanych białek transportujących. Te *błonowe białka transportujące* będą omówione w rozdz. 12. Musimy jednak przedtem rozważyć pewne ogólne zasady dotyczące sposobów, w jakie białka wiążą się z dwuwarstwą lipidową w błonach komórki.

Białka błonowe

Chociaż dwuwarstwa lipidowa stanowi podstawę struktury wszystkich błon w komórce i działa jako bariera przepuszczalności, to większość funkcji błon jest pełniona przez **białka błonowe**. U zwierząt białka stanowią ok. 50% masy większości błon, a reszta przypada na lipidy i względnie małą ilość cukrowców. Ponieważ jednak cząsteczki lipidów są znacznie mniejsze od cząsteczek białek, z reguły w błonach jest 50 razy więcej cząsteczek lipidów niż cząsteczek białek (patrz rys. 11-4).

Tabela 11-1. Przykłady białek błony komórkowej i ich funkcje

Klasy funkcjonalne	Przykład białka	Specyficzna funkcja
Białka transportujące	pompa Na^+	aktywnie wypompowuje z komórki Na^+ i wprowadza do niej K^+
Białka wiążące	integryny	wiążą wewnątrzkomórkowe filamenty aktyny z białkami substancji zewnątrzkomórkowej
Receptory	receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF)	wiąże zewnątrzkomórkowy PDGF i w konsekwencji wytwarza wewnątrzkomórkowe sygnały powodujące wzrost i podział komórki
Enzymy	cyklaza adenylanowa	katalizuje wytwarzanie wewnątrzkomórkowego cyklicznego AMP, w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe



Rys. 11-22. Sposoby związania białek błonowych z dwuwarstwą lipidową. (A) Białka transbłonowe mogą formować w dwuwarstwie albo α helisy — jedną lub więcej, albo zamkniętą strukturę β (beczułka β). (B) Pewne białka błonowe są złączone z dwuwarstwą wyłącznie poprzez kowalencyjnie przyłączoną cząsteczkę lipidu lub samego łańcucha węglowodorowego (*czerwone linie zygzakowate*). (C) Poza tym wiele białek może łączyć się z błoną tylko poprzez słabe, niekowalencyjne oddziaływania z innymi białkami błonowymi

Poza transportowaniem określonych substancji odżywczych, metabolitów i jonów poprzez dwuwarstwę lipidową, białka pełnią w błonach wiele innych funkcji. Pewne białka łączą błonę z makrocząsteczkami po jednej lub drugiej stronie błony. Inne działają jako receptory wykrywające w otoczeniu komórki sygnały chemiczne i przekazujące niesioną przez nie informację do wnętrza komórki, a jeszcze inne działają jako enzymy katalizujące specyficzne reakcje (rys. 11-21; tab. 11-1). Każdy typ błon w komórce zawiera odmienny zestaw białek, stanowiący odbicie szczególnych funkcji takiej błony. W tym podrozdziale omówimy budowę białek błonowych i różne sposoby, którymi mogą się one wiązać z dwuwarstwą lipidową.

Białka błonowe są w różny sposób związane z dwuwarstwą lipidową

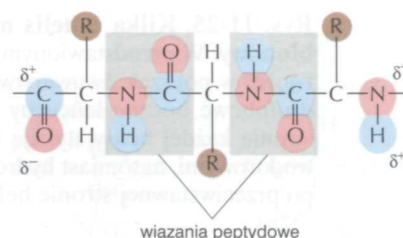
Istnieją trzy główne sposoby związania białek z lipidową dwuwarstwą błon komórki (rys. 11-22).

1. Wiele białek błonowych przechodzi poprzez dwuwarstwę pozostawiając po jednej lub obu jej stronach część swojej cząsteczki (rys. 11-22A). Podobnie jak sąsiadujące z nimi lipidy, te *transbłonowe białka* mają rejony (domeny) zarówno hydrofobowe, jak i hydrofilowe. Ich domeny hydrofobowe leżą we wnętrzu dwuwarstwy, pozostając w kontakcie z hydrofobowymi ogonami cząsteczek lipidów, natomiast domeny hydrofilowe są eksponowane do otoczenia wodnego, po jednej lub obu stronach błony.
2. Inne białka błonowe znajdują się całkowicie poza obrębem dwuwarstwy, będąc w niej tylko zakotwiczone poprzez jedną lub więcej grup lipidowych, złączonych z białkiem kowalencyjnie (rys. 11-22B).
3. Jeszcze inne białka są związane z błoną po jednej lub drugiej stronie tylko poprzez oddziaływanie z innymi białkami błonowymi (rys. 11-22C).

Każde białko błonowe ma w błonie niepowtarzalną orientację: na przykład białko transbłonowe wystawia do cytozolu zawsze tę samą domenę (-y). Orientacja jest konsekwencją sposobu, w jaki białko jest syntetyzowane i wprowadzane do błony, o czym będzie mowa w rozdz. 14.

Białka związane z błoną bezpośrednio — a więc transbłonowe albo zakotwiczone poprzez lipidy lub same łańcuchy węglowodorowe — mogą być uwolnione z błon tylko w drodze rozerwania dwuwarstwy lipidowej

przez detergenty, o czym będzie mowa dalej. Takie białka określa się jako *integralne białka błonowe*. Pozostałe białka błonowe to *peryferyczne białka błonowe*; można je z błony uwolnić stosując łagodne procedury ekstrakcji, które zrywają oddziaływania białko–białko, nie naruszając dwuwarstwy lipidowej.



Rys. 11-23. Wiązania peptydowe. Wiązania peptydowe (na *szarym* tle) łączące dwa przyległe aminokwasy w łańcuch polipeptydowy są polarne i dlatego hydrofilowe. δ^- oznacza częściowy ładunek ujemny, a δ^+ — częściowy ładunek dodatni

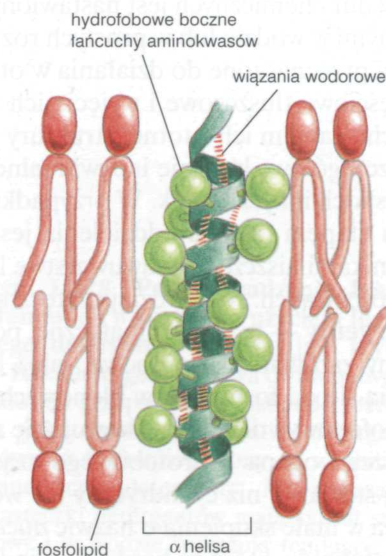
Łańcuch polipeptydowy zazwyczaj przechodzi poprzez dwuwarstwę jako α helisa

Części białka transbłonowego, które wystają na zewnątrz dwuwarstwy lipidowej, są połączone ze sobą specjalnymi transbłonowymi segmentami łańcucha polipeptydowego. Segmenty te, przechodzące przez hydrofobowe otoczenie, jakim jest wnętrze dwuwarstwy lipidowej, są zbudowane głównie z aminokwasów o hydrofobowych łańcuchach bocznych. Ponieważ te łańcuchy boczne nie mogą korzystnie oddziaływać z cząsteczkami wody, preferują otoczenie lipidowe, w którym wody nie ma.

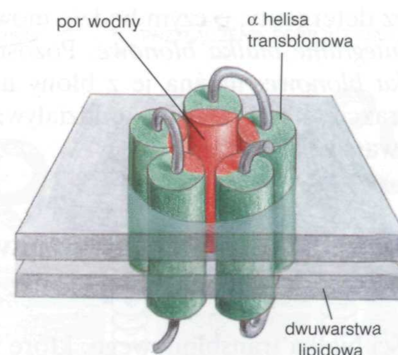
Jednakże, w przeciwieństwie do hydrofobowych łańcuchów bocznych, wiązania peptydowe, które łączą kolejne aminokwasy w białku, są polarne, narzucając rdzeniowi polipeptydu charakter hydrofilowy (rys. 11-23). Ponieważ wody w dwuwarstwie nie ma, atomy tworzące rdzeń ulegają presji tworzenia między sobą wiązań wodorowych, których najwięcej może powstać wtedy, gdy łańcuch polipeptydowy tworzy regularną α helisę; dlatego też ogromna większość transbłonowych domen łańcuchów polipeptydowych przechodzi poprzez dwuwarstwę jako α helisy. W tych spinających obie powierzchnie błony α helisach hydrofobowe łańcuchy boczne aminokwasów są eksponowane na zewnątrz α helisy, gdzie kontaktują się z hydrofobowymi ogonami lipidów, natomiast hydrofilowe części rdzenia polipeptydowego tworzą między sobą wiązania wodorowe wewnątrz α helisy (rys. 11-24).

W wielu białkach transbłonowych łańcuch polipeptydowy przechodzi przez błonę tylko raz (patrz rys. 11-22A). Wiele z tych białek jest receptorami sygnałów zewnątrzkomórkowych: ich zewnątrzkomórkowa domena wiąże cząsteczkę sygnałową, natomiast ich domena cytoplazmatyczna przekazuje sygnał do wnętrza komórki (patrz rys. 11-21).

Inne białka transbłonowe tworzą pory wodne umożliwiające przejście poprzez błonę cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie. Pory takie nie mogą być utworzone przez białka z pojedynczą, jednolicie hydrofobową helisą transbłonową. Potrzebne są do tego bardziej skomplikowane białka transbłonowe, w których łańcuch polipeptydowy przechodzi przez dwuwarstwę kilka razy, albo jako α helisy, albo jako beczułka β (patrz rys. 11-22A). W wielu z tych białek jedną lub więcej domen transbłonowych stanowią α helisy, które zawierają zarówno hydrofobowe, jak i hydrofilowe łańcuchy boczne aminokwasów. Hydrofobowe łańcuchy boczne leżą po tej stronie α helisy, która jest eksponowana do lipidów błony. Hydrofilowe łańcuchy boczne są skupione po stronie przeciwnej, gdzie tworzą część wyścielenia hydrofilowego poru, utworzonego przez kilka α helis zestawionych bokami do siebie w pierścień w obrębie hydrofobowego środowiska



Rys. 11-24. Segment o budowie α helisy przechodzący przez dwuwarstwę lipidową. Hydrofobowe łańcuchy boczne aminokwasów tworzących α helisę stykają się z hydrofobowymi węglowodorowymi ogonami cząsteczek fosfolipidów, natomiast hydrofilowe części łańcucha polipeptydowego tworzą między sobą wiązania wodorowe wewnątrz helisy. Aby taką strukturą spiąć obie powierzchnie dwuwarstwy, potrzeba około 20 aminokwasów



Rys. 11-25. Kilka α helis może utworzyć hydrofilowy por transbłonowy. W przedstawionym przykładzie pięć transbłonowych α helis tworzy w poprzek dwuwarstwy lipidowej kanał wypełniony wodą. Hydrofobowe boczne łańcuchy aminokwasów (kolor *zielony*) po jednej stronie każdej helisy stykają się z hydrofobowymi łańcuchami węglowodorowymi, natomiast hydrofilowe łańcuchy boczne (kolor *czerwony*) po przeciwstawnej stronie helis tworzą por wypełniony wodą

dwuwarstwy lipidowej (rys. 11-25). O tym, jak takie pory działają przy selektywnym transporcie przez błonę małych, rozpuszczalnych w wodzie cząsteczek, będzie mowa w rozdz. 12.

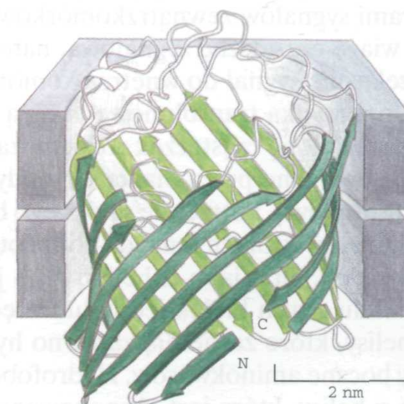
Aczkolwiek α helisa jest zdecydowanie najczęstszą formą, w jakiej łańcuch polipeptydowy przechodzi przez dwuwarstwę lipidową, to jednak łańcuchy polipeptydowe pewnych białek transbłonowych przyjmują w dwuwarstwie lipidowej strukturę β harmonijki (omówioną w rozdz. 5), ugiętą w kształt cylindra, tworzącego rodzaj otwartej z obu stron beczułki, nazywanej *beczułką β*. Jak należało oczekiwać, łańcuchy boczne aminokwasów zwrócone do wnętrza beczułki — i dlatego wyścielające kanał wypełniony wodą — są przeważnie hydrofilowe, natomiast te, które są wystawione na zewnątrz beczułki — i kontaktują się z hydrofobowym rdzeniem dwuwarstwy lipidowej — są wyłącznie hydrofobowe. Najbardziej uderzającym przykładem są tu białka *poryn,* które tworzą duże, wypełnione wodą pory w zewnętrznych błonach mitochondriów (i zewnętrznych błonach pewnych bakterii), gdzie umożliwiają przechodzenie przez błonę małych jonów i metabolitów, zapobiegając równocześnie przejściu dużych cząsteczek (odpowiednio, umożliwiając wejście jonów i substancji odżywczych, a nie dopuszczając dużych cząsteczek antybiotyków i toksyn). Odmiennie niż α helisy, beczułki β mogą tworzyć tylko szerokie kanały, ponieważ istnieją granice określające, jak silnie można ugiąć strukturę β harmonijki, aby utworzyć z niej beczułkę (rys. 11-26). Pod tym względem struktura β jest mniej uniwersalna niż zbiór α helis.

Pytanie 11-4. Wyjaśnij, dlaczego te części łańcucha polipeptydowego większości białek błonowych, które tworzą domeny transbłonowe, mają strukturę α helisy lub beczułki β?

Białka błonowe można przeprowadzić w formę rozpuszczalną w detergentach i oczyszczać

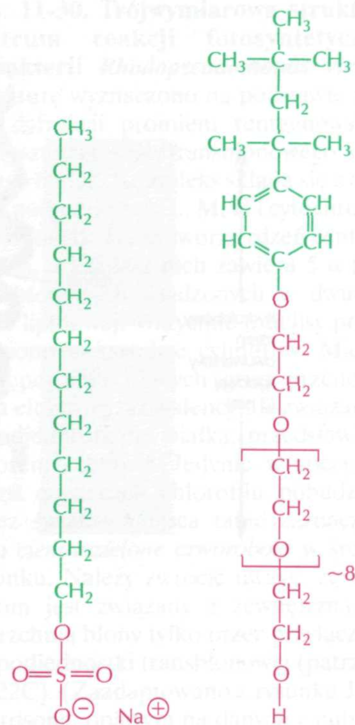
Aby w pełni zrozumieć dane białko, należy znać szczegóły jego budowy, co w przypadku białek błonowych stwarza wyjątkowe problemy. Większość procedur chemicznych jest nastawionych na pracę z cząsteczkami rozpuszczalnymi w wodzie lub w prostych rozpuszczalnikach; jednak białka błonowe są przeznaczone do działania w otoczeniu, które jest częściowo wodne, a częściowe tłuszczowe i wyjęcie ich z tego środowiska oraz oczyszczanie z zachowaniem ich istotnej struktury jest niełatwym zadaniem.

Szczegółowe badanie indywidualnego białka wymaga oddzielenia go od wszystkich innych białek. W przypadku większości białek błonowych pierwszym etapem takiego oddzielenia jest solubilizacja (rozpuszczenie) błony czynnikami niszczącymi dwuwarstwę lipidową przez usunięcie oddziaływań hydrofobowych. Najbardziej użytecznymi czynnikami pod tym względem są **detergenty** — małe, amfipatyczne, podobne do lipidów cząsteczki, mające rejony zarówno hydrofobowe, jak i hydrofilowe (rys. 11-27). Detergenty różnią się od fosfolipidów błonowych tym, że mają tylko pojedynczy ogon hydrofobowy i dlatego zachowują się znacząco odmiennie. Z powodu pojedynczego ogona hydrofobowego cząsteczki detergentu mają kształt bardziej stożkowy niż cylindryczny i w wodzie wykazują tendencję do agregowania w małe skupienia o nazwie *micele*, a nie tworzą dwuwarstw, jak robią to fosfolipidy, które są bardziej cylindryczne. Zmieszane w dużym nadmia-



Rys. 11-26. Trójwymiarowa struktura białka poryny w zewnętrznej błonie bakterii (*Rhodobacter capsulatus*), wyznaczona metodą krystalografii rentgenowskiej. Białko to występuje w formie 16-pasmowej struktury β, która owijając się wokół siebie tworzy wypełniony wodą kanał transbłonowy. Aczkolwiek opuszczono to na rysunku, trzy białka poryny asocjują w trymer o trzech oddzielnych kanałach (Z: S. W. Cowan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 501–507, 1993)

Rys. 11-27. Budowa dwóch powszechnie stosowanych detergentów. Dodecylosiarczan sodu (SDS) jest silnym detergentem jonowym (tj. mającym przy swym hydrofilowym końcu grupę zjonizowaną), a Tryton X-100 jest łagodnym detergentem niejonowym (tj. mającym przy swym hydrofilowym końcu strukturę polarną, ale niezjonizowaną). Hydrofobową część każdego detergentu zaznaczono kolorem *zielonym*, a część hydrofilową kolorem *czerwonym*. Ujęta w klamrę część struktury Trytonu X-100 powtarza się w cząsteczce ok. ośmiu razy. Silne detergenty jonowe, takie jak SDS, nie tylko oddzielają cząsteczki lipidów od białek, ale również rozfałdowują białka (patrz panel 5-5, s. 162–163)

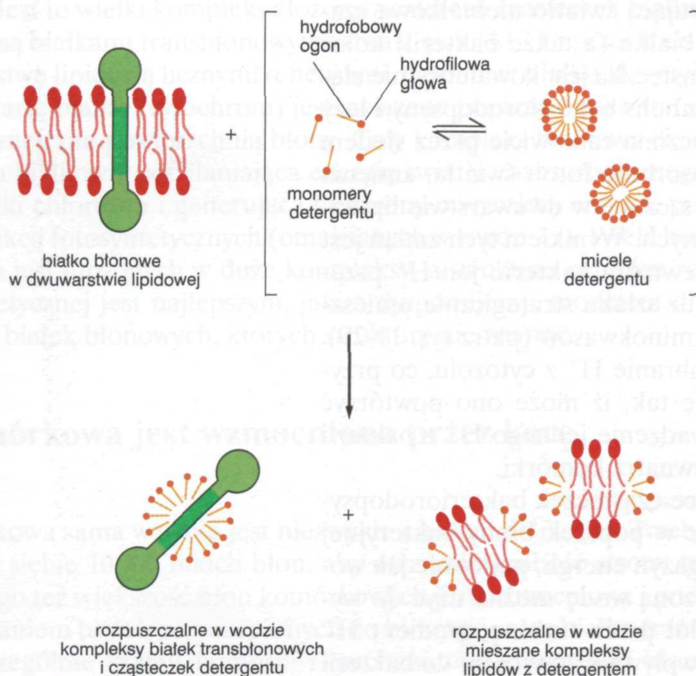


rze z błonami, hydrofobowe końce cząsteczek detergentu wiążą się zarówno z transbłonowymi hydrofobowymi domenami białek błonowych, jak i z hydrofobowymi ogonami cząsteczek fosfolipidów, rozdzielając przez to białka od fosfolipidów. Ponieważ drugi koniec cząsteczki detergentu jest hydrofilowy, takie wiązanie powoduje przeprowadzenie białek błonowych do roztworu jako kompleksów białka z detergentem (rys. 11-28). W tym samym czasie detergent powoduje solubilizację fosfolipidów. Kompleksy białek z detergentami można oddzielić zarówno od siebie, jak i od kompleksów lipidów z detergentami, stosując technikę taką jak elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS (omówioną w rozdz. 5).

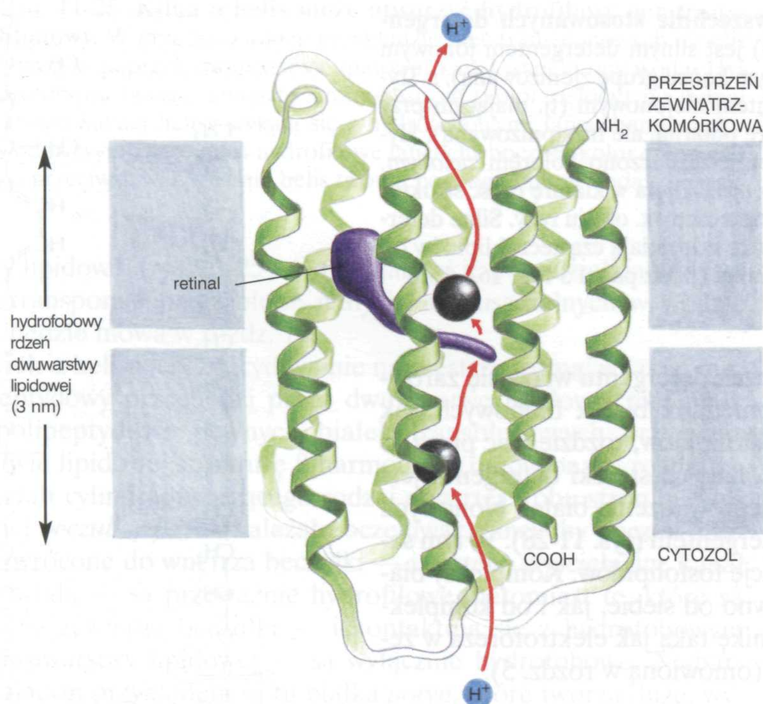
Całkowita struktura jest znana tylko w przypadku bardzo niewielu białek błonowych

Znaczną część naszej wiedzy o strukturze białek błonowych zdobyto pośrednio. Standardową bezpośrednią metodą określenia struktury białka jest krystalografia rentgenowska (omówiona w rozdz. 5); wymaga ona jednak uporządkowanego krystalicznego układu badanej cząsteczki, a krystalizacja białek błonowych okazała się bardzo trudna. Dwoma godnymi uwagi wyjątkami są jednakże *bakteriorodopsyna* i *centrum reakcji fotosyntetycznej*; oba te błonowe białka bakterii pełnią ważną rolę w wychwytywa-

Pytanie 11-5. Wyjaśnij, dlaczego w przypadku dwóch detergentów przedstawionych na rys. 11-27 części cząsteczek zaznaczone kolorem *czerwonym* są hydrofilowe, a zaznaczone kolorem *zielonym* — hydrofobowe? Narysuj (stosując podobny schemat kolorów) krótki odcinek łańcucha polipeptydowego zbudowany z trzech aminokwasów mających hydrofobowe łańcuchy boczne (patrz panel 2-5, s. 62–63).



Rys. 11-28. Przeprowadzenie białek błonowych w roztwór z użyciem łagodnego detergentu, takiego jak Tryton X-100. Detergent rozrywa dwuwarstwę lipidową i przeprowadza białka do roztworu jako kompleksy białko–detergent. Również fosfolipidy błony są solubilizowane przez detergenty. Jak pokazano, cząsteczki detergentów mają kształt stożkowy i w wodzie wykazują tendencję do agregowania w skupienia, zwane micelami

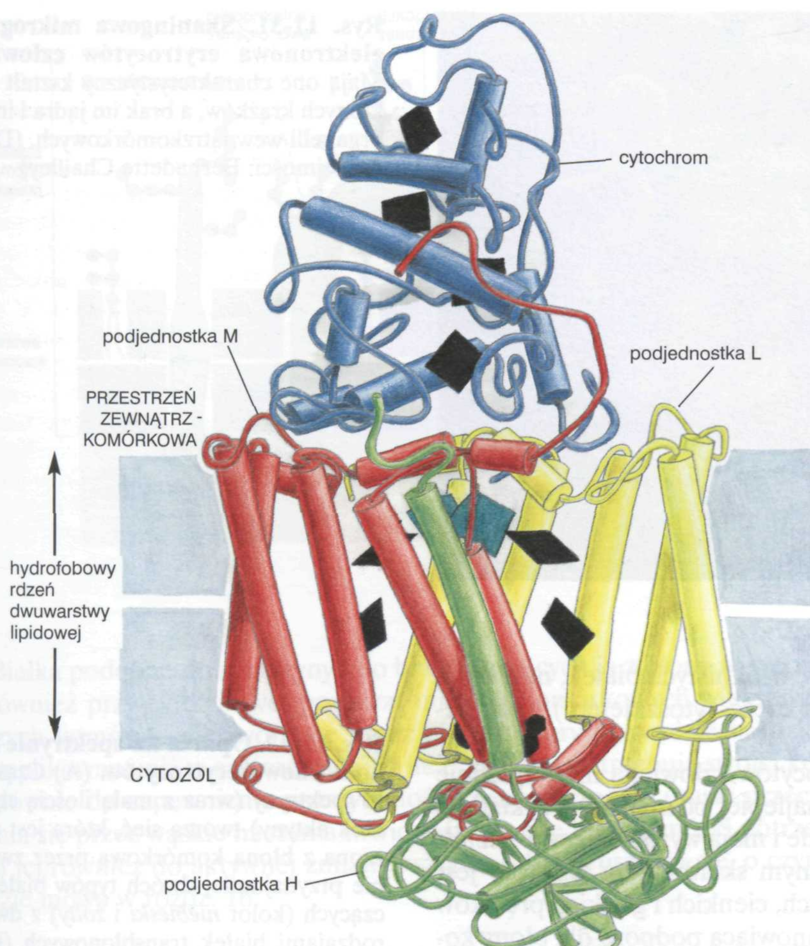


Rys. 11-29. Przestrzenna budowa cząsteczki bakteriorodopsyny. Łańcuch polipetydowy przechodzi przez dwuwarstwę lipidową jako siedem α helis. Pokazano umiejscowienie retinalu i prawdopodobną drogę, jaką wędrują protony w przebiegu napędzanego światłem cyklu ich pompowania; kolorem *czarnym* zaznaczono dwa łańcuchy boczne aminokwasów, które prawdopodobnie biorą udział w procesie przenoszenia H^+. Retinal służy również do wykrywania światła w siatkówce naszych oczu, w której jest on związany z białkiem o strukturze bardzo podobnej do bakteriorodopsyny. (Zaadaptowano z rysunku R. Hendersona i in., *J. Mol. Biol*. 213: 899–929, 1990)

niu i użytkowaniu energii światła słonecznego. Poznanie struktury tych dwóch białek pozwoliło zrozumieć, jak α helisy przechodzą przez dwuwarstwę lipidową, a także, jak z różnych cząsteczek białka mogą zostać w błonie zmontowane funkcjonalne kompleksy.

Strukturę **bakteriorodopsyny** pokazano na rys. 11-29. To małe białko (o ok. 250 aminokwasach) występuje w dużych ilościach w błonie komórkowej archebakterii, *Halobacterium halobium*, żyjącej w bardzo słonych zbiornikach naturalnych i miejscach odzysku soli morskiej. Bakteriorodopsyna działa jak transbłonowe białko transportujące, wypompowujące H^+ z bakterii. Wypompowanie to wymaga energii, którą bakteriorodopsyna uzyskuje bezpośrednio ze światła słonecznego. Każda cząsteczka bakteriorodopsyny zawiera prostą, absorbującą światło niebiałkową cząsteczkę o nazwie *retinal* — która nadaje białku (a także bakterii) kolor ciemnofioletowy. Ta mała hydrofobowa cząsteczka jest kowalencyjnie złączona z jedną z siedmiu transbłonowych α helis bakteriorodopsyny i leży w płaszczyźnie dwuwarstwy lipidowej, otoczona całkowicie przez siedem α helis (patrz rys. 11-29). Gdy retinal absorbuje foton światła, zmienia swój kształt, co powoduje, że białko umieszczone w dwuwarstwie lipidowej ulega serii małych zmian konformacyjnych. Wynikiem tych zmian jest przeniesienie jednego H^+ z retinalu na zewnątrz bakterii: jon H^+ przemieszcza się w poprzek dwuwarstwy wzdłuż szlaku strategicznie umieszczonych, polarnych bocznych łańcuchów aminokwasów (patrz rys. 11-29). Retinal regeneruje się następnie przez pobranie H^+ z cytozolu, co przywraca białku jego wyjściową konformację tak, iż może ono powtórzyć cykl. Sumarycznym wynikiem jest wyprowadzenie jednego H^+ z bakterii na zewnątrz, co zmniejsza stężenie H^+ wewnątrz komórki.

W obecności światła słonecznego tysiące cząsteczek bakteriorodopsyny wypompowują H^+ z komórki, tworząc w poprzek błony bakteryjnej gradient stężenia H^+, który służy jako magazyn energii, podobnie jak woda zatrzymana tamą. Podobnie jak spiętrzoną wodę można użyć do wytwarzania elektryczności, jeśli płynie w dół przez turbinę, gradient H^+ można użyć do wytwarzania ATP, gdy H^+ wpływa z powrotem do bakterii



Rys. 11-30. Trójwymiarowa struktura centrum reakcji fotosyntetycznej u bakterii *Rhodopseudomonas viridis*. Strukturę wyznaczono na podstawie analizy dyfrakcji promieni rentgenowskich w kryształach tego transbłonowego kompleksu białek. Kompleks składa się z czterech podjednostek: L, M, H i cytochromu. Podjednostki L i M tworzą rdzeń centrum reakcji, a każda z nich zawiera 5 α helis transbłonowych osadzonych w dwuwarstwie lipidowej. Wszystkie α helisy przedstawiono w kształcie cylindrów. Miejsca występowania różnych grup przenoszących elektrony, kowalencyjnie związanych z podjednostkami białka, przedstawiono kolorem *czarnym*. Jedynie w specjalnej parze cząsteczek chlorofilu pobudzanej przez światło miejsca takie zaznaczono jako *ciemnozielone czworoboki* w środku rysunku. Należy zwrócić uwagę, że cytochrom jest związany z zewnętrzną powierzchnią błony tylko przez przyłączenie do podjednostki transbłonowej (patrz rys. 11-22C). (Zaadaptowano z rysunku J. Richardsona, opartym na danych z publikacji: J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber i H. Michael, *Nature* 318; 618–624, 1985)

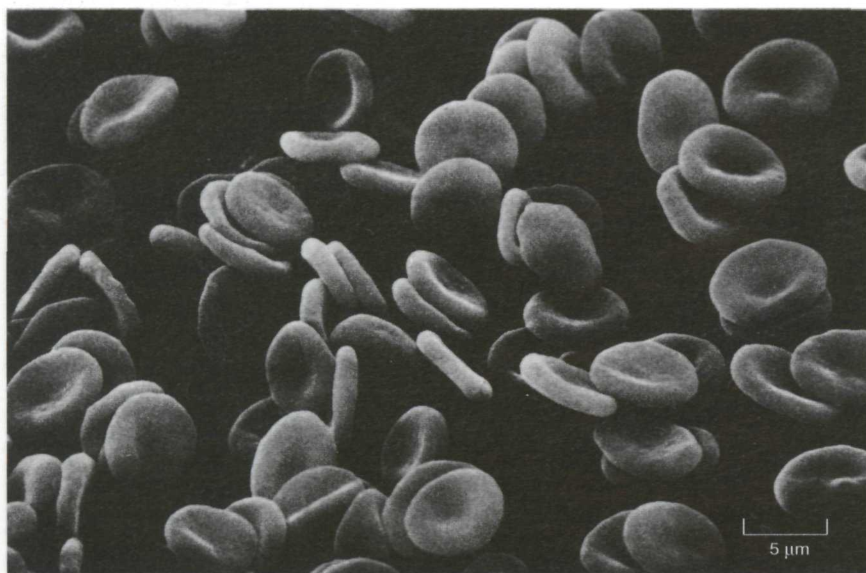
przez inne białko błonowe — *syntazę* ATP. Ten sam typ syntazy ATP wytwarza większość ATP w komórkach roślin i zwierząt, o czym będzie mowa w rozdz. 13.

Strukturę bakteryjnego *centrum reakcji fotosyntetycznej* przedstawiono na rys. 11-30. Jest to wielki kompleks złożony z czterech cząsteczek białka, z których trzy są białkami transbłonowymi; dwa z nich (M i L) przechodzą przez dwuwarstwę lipidową licznymi α helisami, natomiast białko H — tylko jedną. Czwarte białko (cytochrom) jest związane poprzez białka transbłonowe z zewnętrzną powierzchnią błony. Cały kompleks białkowy działa jak maszyna białkowa, pochłaniająca energię światła zaabsorbowanego przez cząsteczki chlorofilu i generująca elektrony o wysokiej energii, potrzebne do reakcji fotosyntetycznych (omawianych w rozdz. 13). Wiele białek błonowych jest ułożonych w duże kompleksy, a struktura centrum reakcji fotosyntetycznej jest najlepszym, jakim dysponujemy, modelem dla tysięcy innych białek błonowych, których struktury nie znamy.

Pytanie 11-6. Przyjrzyj się strukturze centrum reakcji fotosyntetycznej na rys. 11-30. Jak można było oczekiwać, w błonie występuje wiele α helis. Jednakże w prawym dolnym rogu znajduje się odcinek łańcucha polipeptydowego podjednostki L, który tworzy nieuporządkowaną pętlę w obrębie hydrofobowego rdzenia dwuwarstwy lipidowej. Czy przekreśla to ogólną zasadę, że białka transbłonowe przyjmują w dwuwarstwie lipidowej strukturę α helis lub beczułek β?

Błona komórkowa jest wzmocniona przez korę komórki

Błona komórkowa sama w sobie jest niezwykle cienka i delikatna. Trzeba by nałożyć na siebie 10000 takich błon, aby otrzymać grubość strony tej książki. Dlatego też większość błon komórkowych jest wzmocniona i podparta rusztowaniem białek przyczepionych do błony poprzez białka transbłonowe. Szczególnie kształt komórki i mechaniczne właściwości błony

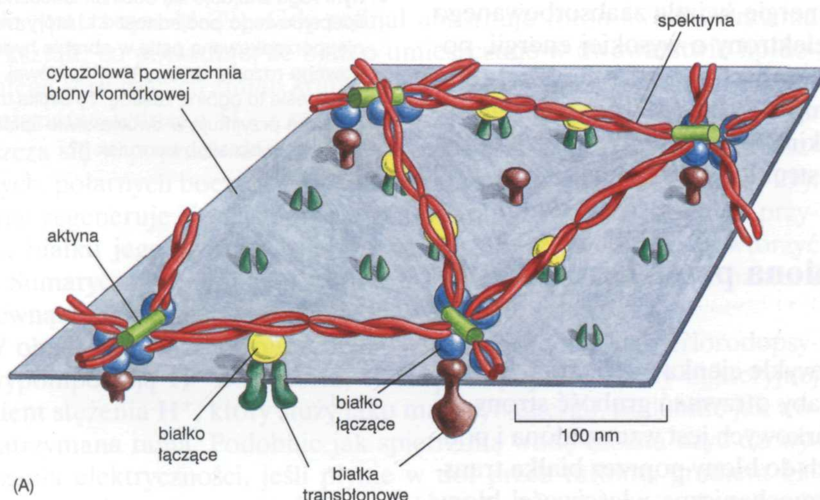


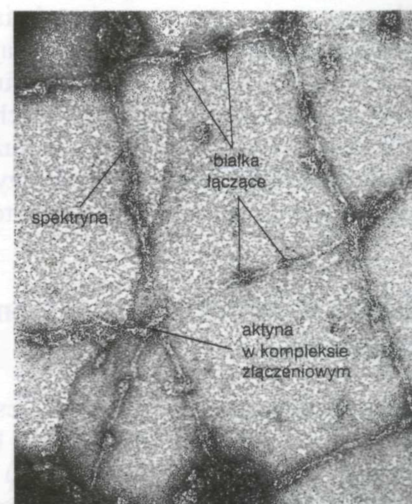
Rys. 11-31. Skaningowa mikrografia elektronowa erytrocytów człowieka. Mają one charakterystyczny kształt wpuklonych krążków, a brak im jądra i innych organelli wewnątrzkomórkowych. (Dzięki uprzejmości: Bernadette Chailley)

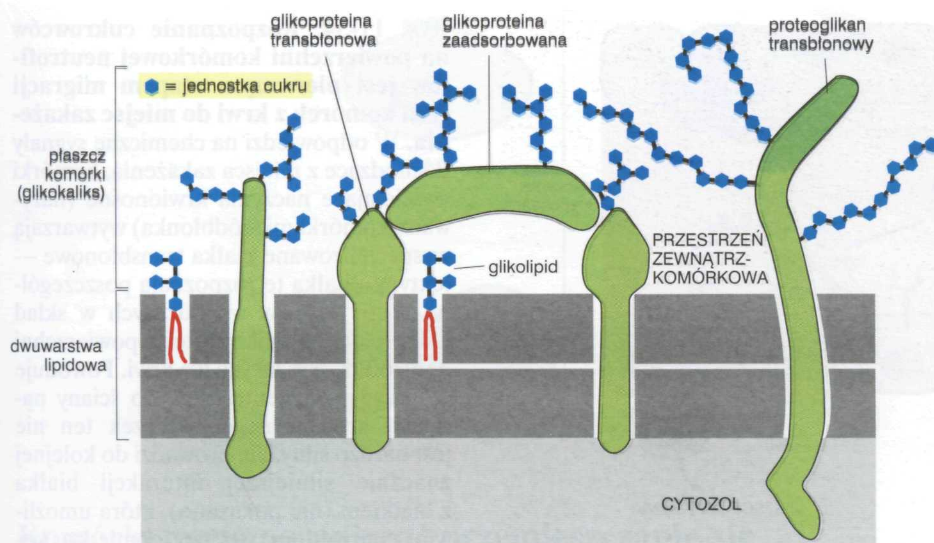
komórkowej są zdeterminowane przez sieć włóknistych białek, nazywaną *korą komórki* (a stanowiącą przybłonową część cytoszkieletu), przyczepioną do cytozolowej powierzchni błony.

Przybłonowa część cytoszkieletu erytrocytów człowieka ma względnie prostą i regularną strukturę i jest także najlepiej poznanym przykładem kory komórki. Komórki erytrocytów są małe i mają wyróżniający je kształt wklęśniętych krążków (rys. 11-31). Głównym składnikiem ich kory jest białko *spektryna* mające kształt wydłużonych, cienkich i giętkich pręcików o długości ok. 100 nm. Tworzy ona sieć stanowiącą podporę dla błony komórkowej i utrzymującą kształt komórki. Sieć spektrynowa jest połączona z błoną poprzez wewnątrzkomórkowe białka łączące, które wiążą spektrynę ze specyficznymi białkami transbłonowymi (rys. 11-32). Znaczenie tej sieci uwidacznia się u tych myszy i ludzi, u których występują genetyczne nieprawidłowości dotyczące budowy spektryny. Osobniki takie cierpią na anemię, mają mniej erytrocytów niż osobniki nie mające niedokrwistości, a same erytrocyty zamiast być kuliste, są spłaszczone i niezwykle delikatne.

Rys. 11-32. Oparta na spektrynie kora komórkowa erytrocytów. (A) Cząsteczki spektryny (wraz z małą ilością cząsteczek aktyny) tworzą sieć, która jest połączona z błoną komórkową przez związanie przynajmniej dwóch typów białek łączących (kolor *niebieski* i *żółty*) z dwoma rodzajami białek transbłonowych (kolor *brązowy* i *zielony*). Mikrografia elektronowa (B) przedstawia sieć spektrynową po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej erytrocytu. Sieć rozciągnięto, aby pokazać szczegóły jej budowy; w normalnej komórce pokazana tutaj sieć zajęłaby tylko jedną dziesiątą tego obszaru. (B — udostępnili: T. Byers, D. Branton, *Proc. Natl. Acad. Sic. USA* 82: 6153–6157, 1985)







Rys. 11-33. Uproszczony schemat glikokaliksu komórki eukariotycznej. Glikokaliks jest zbudowany z bocznych łańcuchów oligosacharydowych przyłączonych do glikolipidów, glikoprotein błonowych oraz z łańcuchów polisacharydowych, włączonych w proteoglikany błonowe. W skład glikokaliksu mogą wchodzić również takie glikoproteiny i proteoglikany, które zostały wydzielone przez komórkę, a następnie zwrotnie zaabsorbowane na jej powierzchni. Należy zwrócić uwagę, że wszystkie cukrowce są umieszczone na zewnątrzkomórkowej (niecytozolowej) powierzchni błony komórkowej)

Białka podobne do spektryny i do białek łączących ją z błoną występują również przy cytozolowej powierzchni błon komórkowych większości naszych komórek, ale tworzone przez nie struktury są o wiele bardziej skomplikowane niż w erytrocytach. O ile erytrocyty potrzebują swojej kory głównie do zapewnienia wytrzymałości mechanicznej w czasie przeciskania się przez wąskie naczynia krwionośne, o tyle inne komórki potrzebują jej również do aktywnej zmiany kształtu i do poruszania się, o czym będzie mowa w rozdz. 16.

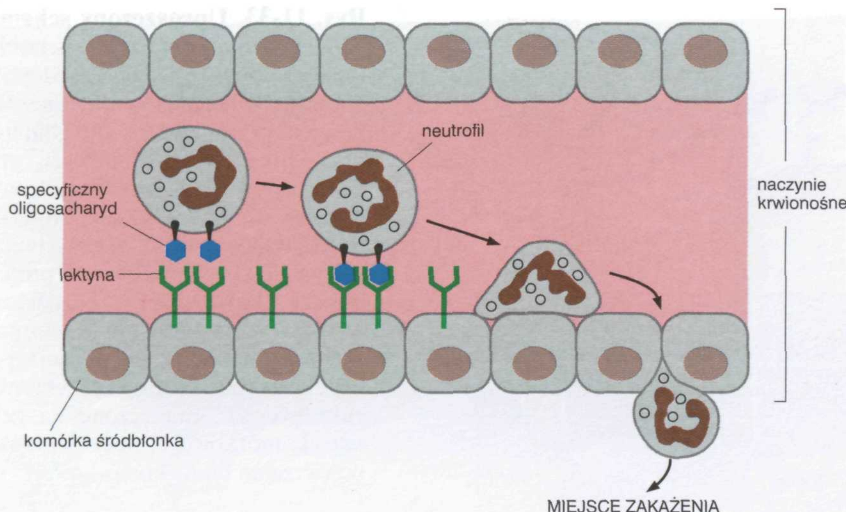
Pytanie 11-7. Przyjrzyj się dokładnie białkom transbłonowym przedstawionym na rys. 11-32A. Co można powiedzieć o ich ruchliwości w błonie?

Powierzchnia komórki jest pokryta cukrowcami

Dowiedzieliśmy się wcześniej, że w komórkach eukariotycznych wiele lipidów wchodzących w skład zewnętrznej warstwy błony komórkowej ma przyłączone kowalencyjnie cukry. To samo dotyczy większości białek zawartych w błonie komórkowej. Do większości tych białek są przyłączone krótkie łańcuchy cukrowe, czyli *oligosacharydy*, i stąd nazwa tych białek — **glikoproteiny**. Inne białka błonowe, do których jest przyłączonych jeden lub więcej długich łańcuchów polisacharydowych, to *proteoglikany*. Wszystkie cukrowce wchodzące w skład glikoprotein, proteoglikanów i glikolipidów są umieszczone tylko po jednej stronie błony przeciwstawnej do strony pozacytozolowej i tworzą na powierzchni komórki płaszcz cukrowcowy o nazwie **glikokaliks** (rys. 11-33).

Glikokaliks jest istotnym elementem ochrony powierzchni komórki przed uszkodzeniem mechanicznym i chemicznym. Ponieważ oligosacharydy i polisacharydy wchłaniają wodę, powodują śliskość powierzchni komórki. Pozwala to komórkom ruchliwym, takim jak krwinki białe, przeciskać się przez wąskie przestrzenie i zapobiega przylepianiu się krwinek do siebie lub do ścian naczyń krwionośnych.

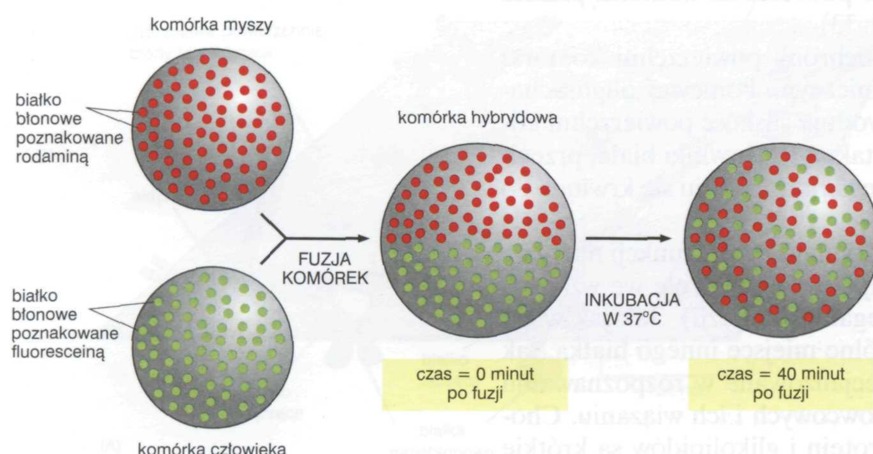
Jednakże cukrowce powierzchni komórki mają więcej funkcji niż tylko ochrona i zapewnienie śliskości. Odgrywają one ważną rolę we wzajemnym rozpoznawaniu komórek i ich przyleganiu (adhezji). Tak jak wiele białek może rozpoznawać i wiązać szczególne miejsce innego białka, tak pewne białka (o nazwie *lektyny*) są wyspecjalizowane w rozpoznawaniu poszczególnych bocznych łańcuchów cukrowcowych i ich wiązaniu. Chociaż boczne łańcuchy cukrowcowe glikoprotein i glikolipidów są krótkie



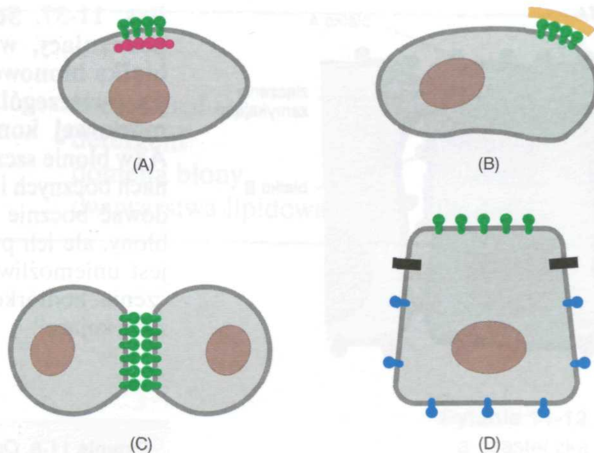
Rys. 11-34. Rozpoznanie cukrowców na powierzchni komórkowej neutrofilów jest pierwszym etapem migracji tych komórek z krwi do miejsc zakażenia. W odpowiedzi na chemiczne sygnały dochodzące z miejsca zakażenia, komórki wyścielające naczynia krwionośne (nazywane komórkami śródbłonka) wytwarzają wyspecjalizowane białka transbłonowe — lektyny. Białka te rozpoznają poszczególne grupy cukrów wchodzących w skład glikolipidów i glikoprotein powierzchni neutrofilów krążących we krwi. Powoduje to przywarcie neutrofilów do ściany naczynia krwionośnego. Związek ten nie jest bardzo silny, ale prowadzi do kolejnej znacznie silniejszej interakcji białka z białkiem (nie pokazano), która umożliwia neutrofilom wejście pomiędzy komórki śródbłonka i dalej do tkanki, w miejscu, gdzie wystąpiło zakażenie

(zawierając zazwyczaj mniej niż 15 jednostek cukrowych), to jednak wykazują ogromną różnorodność. W odróżnieniu od łańcuchów polipeptydowych (białek), w których wszystkie aminokwasy są połączone ze sobą liniowo przez identyczne wiązania peptydowe (patrz rys. 11-23), cukry mogą się łączyć ze sobą różnymi typami wiązań i w różnych sekwencjach, często tworząc rozgałęzione łańcuchy oligosacharydowe (patrz panel 2-3, s. 56–57). Na przykład już trzy grupy cukrowe mogą być łączone ze sobą w tak różnych kombinacjach wiązań kowalencyjnych, że utworzą setki różnych trisacharydów.

W organizmie wielokomórkowym glikokaliks może więc służyć jako rodzaj wyróżniającego okrycia, podobnie jak jest nim mundur policjanta, charakterystycznego dla komórek wyspecjalizowanych w określonej funkcji i rozpoznawanego przez inne komórki, z którymi muszą one oddziaływać. Na przykład specyficzne oligosacharydy zawarte w glikokaliksie biorą udział w rozpoznawaniu komórki jajowej przez plemnik. Pełnią one również istotną rolę w powstawaniu odczynów zapalnych; tak więc, we wczesnych stadiach infekcji bakteryjnej cukrowiec na powierzchni krwinek białych nazywanych *neutrofilami* jest rozpoznawany przez lektynę znajdującą się na komórkach wyścielających naczynia krwionośne w miejscu infekcji. Ten proces rozpoznawania powoduje, że neutrofile przywierają do ścian naczyń, a następnie migrują z krwiobiegu do zakażonych tkanek, gdzie pomagają w usuwaniu bakterii (rys. 11-34).



Rys. 11-35. Doświadczenie demonstrujące mieszanie się białek błon komórkowych w komórce hybrydowej powstałej z komórek myszy i człowieka. Początkowo białka myszy i człowieka pozostają w odpowiednich połówkach błony komórkowej nowo utworzonej komórki hybrydowej, ale w krótkim czasie ulegają one wymieszaniu. W celu oznaczenia białek dwa przeciwciała, z których jedno wiąże się z białkiem człowieka, a drugie z białkiem myszy, zostały oznakowane odmiennymi znacznikami fluoryzującymi (rodaminą lub fluoresceiną) i dodane do komórek. W mikroskopie fluorescencyjnym oba fluoryzujące przeciwciała można rozróżnić, ponieważ fluoresceina jest zielona, a rodamina jest czerwona



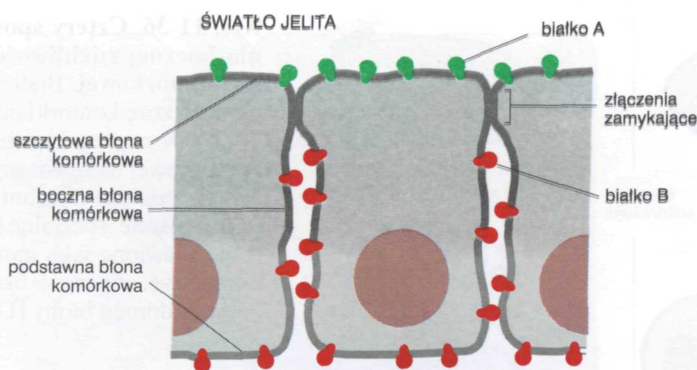
Rys. 11-36. Cztery sposoby ograniczania bocznej ruchliwości białek w błonie komórkowej. Białka mogą być wczepione w korę komórki od wnętrza komórki (A), w cząsteczki substancji zewnątrzkomórkowej na zewnątrz komórki (B) lub w białka na powierzchni innych komórek (C). Wreszcie, specjalne bariery dyfuzyjne (przedstawione jako *czarne* słupki) mogą ograniczyć obecność białka do poszczególnych domen błony (D)

Komórki mogą ograniczać przemieszczanie się białek błonowych

Ponieważ błona jest dwuwymiarowym płynem, wiele jej białek, podobnie jak i lipidów, może swobodnie poruszać się w obrębie płaszczyzny dwuwarstwy lipidowej. Można to w sposób łatwy i oczywisty wykazać, doprowadzając do fuzji komórki myszy z komórką ludzką, tworząc podwójnej wielkości komórkę hybrydową, a następnie śledząc rozmieszczenie białek błony komórkowej zarówno myszy, jak i człowieka. Aczkolwiek na początku białka te pozostaną na powierzchni swych odpowiednich połówek nowo powstałej komórki hybrydowej, to już po niecałej godzinie dwa zestawy tych białek zostaną równomiernie wymieszane na całej powierzchni komórki (rys. 11-35).

Jednakże obraz morza lipidów, w którym wszystkie białka pływają swobodnie, jest zbyt uproszczony. Komórki mają swoje sposoby ograniczenia lokalizacji poszczególnych białek błony komórkowej do pewnych pól dwuwarstwy, co prowadzi do powstania na powierzchni komórki wyspecjalizowanych funkcjonalnie obszarów, czyli **domen błonowych**. Niektóre ze sposobów ograniczania ruchu białek błonowych zestawiono na rys. 11-36.

Białka mogą być złączone z trwałymi strukturami na zewnątrz komórki, na przykład z cząsteczkami substancji międzykomórkowej (o czym będzie mowa w rozdz. 19). Białka błonowe mogą być także zakotwiczone do względnie nieruchomych struktur wewnątrz komórki, zwłaszcza do rozwiniętej pod powierzchnią błony komórkowej części cytoszkieletu, czyli kory komórki (patrz rys. 11-32). W końcu, komórki mogą wytwarzać bariery ograniczające obecność poszczególnych składników błony do jednej domeny błonowej. Na przykład w komórkach nabłonka wyścielającego jelito ważne jest, aby białka transportujące, działające przy pobieraniu substancji odżywczych z jelita, występowały tylko w *szczytowej* powierzchni komórek (powierzchni zwróconej do światła jelita) oraz aby obecność innych białek, wyprowadzających rozpuszczone substancje z komórki nabłonkowej do tkanek i krwiobiegu, była ograniczona do powierzchni *podstawnej* i *bocznej* (rys. 11-37). To asymetryczne rozmieszczenie białek błonowych jest zachowywane dzięki barierze utworzonej wzdłuż strefy, w której komórka jest zespolona z przyległymi komórkami nabłonkowymi przez tak zwane *połączenia zamykające*. W miejscu tym wyspecjalizowane białka łączące formują wokół komórki ciągły pas, gdzie kontaktuje się ona ze swoimi sąsiadami, wytwarzając ścisłe zespolenie pomiędzy przylegającymi do siebie błonami komórkowymi. Białka błonowe nie mogą w drodze dyfuzji przekroczyć tego połączenia.



Rys. 11-37. Schemat nabłonka jelita pokazujący, w jaki sposób obecność białka błonowego zostaje ograniczona do poszczególnej domeny błony komórkowej komórki nabłonka. Białko A (w błonie szczytowej) i białko B (w błonach bocznych i podstawnej) mogą dyfundować bocznie w obrębie swych domen błony, ale ich przejście do innych domen jest uniemożliwione przez specjalne złączenia komórkowe o nazwie „złączenia zamykające"

W następnym rozdziale przyjrzymy się poszczególnym procesom transportu cząsteczek z komórki i do jej wnętrza, kierowanym przez te białka, o których wybiórcze umiejscowienie na swej powierzchni komórka tak bardzo dba.

Pytanie 11-8. Opisz różne metody, które komórki stosują, aby występowanie białek ograniczyć do specyficznych obszarów błony komórkowej. Czy błona mająca wiele zakotwiczonych białek jest nadal płynna?

Streszczenie

- Błony umożliwiają komórce stworzenie barier pozwalających na utrzymanie poszczególnych typów cząsteczek w obrębie określonych przedziałów.
- Błony w komórce stanowią ciągłą dwuwarstwę cząsteczek lipidów, w której są umieszczone białka.
- Dwuwarstwa lipidowa stanowi podstawową strukturę wszystkich błon w komórce i umożliwia ich funkcję barierową.
- Cząsteczki lipidów błonowych mają rejony zarówno hydrofobowe, jak i hydrofilowe. Po umieszczeniu w wodzie układają się one spontanicznie w dwuwarstwę, tworząc zamknięte przedziały, które w przypadku rozdarcia natychmiast się zasklepiają.
- Istnieją trzy główne klasy cząsteczek lipidów błonowych: fosfolipidy, steroidy i glikolipidy.
- Dwuwarstwa lipidowa jest płynna, a poszczególne cząsteczki lipidów mogą dyfundować w obrębie swej własnej monowarstwy; nie mogą one jednak spontanicznie przechodzić ruchem „flip-flop" z jednej takiej warstwy do drugiej.
- Dwie pojedyncze warstwy dwuwarstwy lipidowej mają odmienny skład lipidowy, co stanowi odbicie odmiennych funkcji pełnionych przez każdą ze stron błony w komórce.
- Komórki dopasowują płynność swych błon w drodze modyfikowania składu lipidowego tych błon.
- Dwuwarstwa lipidowa jest nieprzepuszczalna dla wszystkich jonów i dużych cząsteczek polarnych, ale jest przepuszczalna dla małych cząsteczek niepolarnych, takich jak tlen i dwutlenek węgla, oraz dla bardzo małych cząsteczek polarnych, takich jak woda.
- Białka błonowe są odpowiedzialne za większość funkcji pełnionych przez błonę, takich jak np. transport poprzez dwuwarstwę lipidową małych, rozpuszczalnych w wodzie cząsteczek.
- Białka transbłonowe przechodzą poprzez dwuwarstwę lipidową zazwyczaj w formie α helisy (jednej lub więcej), ale czasem także w postaci struktury β tworzącej beczułkę.
- Inne białka błonowe nie przechodzą poprzez dwuwarstwę lipidową, ale są przyczepione od zewnątrz do jednej lub drugiej strony błony albo dzięki niekowalencyjnemu związaniu z białkami transbłonowymi, albo za pomocą kowalencyjnie przyłączonych lipidów lub łańcuchów węglowodorowych.
- Do licznych białek i pewnych lipidów eksponowanych na powierzchni komórki są przyłączone łańcuchy cukrów, które ochraniają powierzchnie komórki i nadają jej właściwości śluzowe oraz biorą udział we wzajemnym rozpoznawaniu się komórek.
- Większość błon komórkowych jest wsparta na złączonej z nimi ramce białek. Przykładem jest siateczka włóknistych białek tworzących pod powierzchnią błony komórkowej tzw. korę, czyli zewnętrzną część cytoszkieletu.
- Chociaż wiele białek błonowych może szybko dyfundować w płaszczyźnie błony, istnieją sposoby, którymi komórki mogą ograniczyć obecność białek do specyficznych domen błony komórkowej oraz unieruchomić poszczególne białka przez przyczepianie ich do wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowych makrocząsteczek.

Hasła

amfipatyczność	cholesterol	fosfatydylocholina	glikoproteina
bakteriorodopsyna	detergent	fosfolipid	nasycone (wiązanie)
białko błonowe	domena błony	glikokaliks	nienasycone (wiązanie)
błona komórkowa	dwuwarstwa lipidowa	glikolipid	

Pytania

Pytanie 11-9. Które z następujących twierdzeń są poprawne? Wyjaśnij swoje odpowiedzi.

A. W dwuwarstwie lipidowej lipidy obracają się szybko wokół swej długiej osi.

B. W dwuwarstwie lipidowej lipidy szybko wymieniają swe pozycje w płaszczyźnie błony.

C. W dwuwarstwie lipidowej lipidy tylko z trudnością przemieszczają się ruchem typu „flip-flop" z jednej monowarstwy lipidowej do drugiej.

D. Wiązania wodorowe powstające pomiędzy grupami głowy lipidów i cząsteczkami wody stale pękają i tworzą się na nowo.

E. Glikolipidy przemieszczają się podczas swej syntezy z błony zamykającej przedział do błon innych przedziałów, ale zawsze pozostają po tej samej stronie dwuwarstwy lipidowej.

F. Margaryna zawiera więcej lipidów nasyconych niż olej roślinny, z którego jest zrobiona.

G. Pewne białka błonowe są enzymami.

H. Płaszcz cukrowców otaczający wszystkie komórki, czyli glikokaliks, powoduje, że komórki są bardziej śliskie.

Pytanie 11-10. Co oznacza termin „płyn dwuwymiarowy"?

Pytanie 11-11. Struktura dwuwarstwy lipidowej jest określona przez poszczególne właściwości budujących ją cząsteczek lipidów. Co by się stało, gdyby...

A. fosfolipidy miały zamiast dwóch tylko jeden łańcuch węglowodorowy?

B. łańcuchy węglowodorowe były krótsze niż normalnie, np. miały tylko 10 atomów węgla?

C. wszystkie łańcuchy węglowodorowe były nasycone?

D. wszystkie łańcuchy węgla były nienasycone?

E. dwuwarstwa lipidowa zawierała mieszaninę dwóch rodzajów cząsteczek lipidów, jednych o dwóch ogonach węglowodorowych nasyconych i innych o dwóch ogonach węglowodorowych nienasyconych?

F. każda cząsteczka lipidów była kowalencyjnie związana poprzez końcowy atom węgla jednego z jej łańcuchów węglowodorowych z cząsteczką lipidu w przeciwstawnej warstwie pojedynczej?

Pytanie 11-12. Jakie są różnice między cząsteczką lipidu a cząsteczką detergentu? Jak musiałaby się zmienić budowa cząsteczki lipidu, aby przekształcić tę cząsteczkę w detergent?

Pytanie 11-13. Wymień następujące składniki w kolejności wzrastającej zdolności przenikania przez błonę: RNA, Ca^{2+}, glukoza, etanol, N_2, woda.

Pytanie 11-14

A. Cząsteczki lipidów wymieniają się miejscem z sąsiednimi lipidami co 10^{-7} sekund. Cząsteczka lipidu dyfunduje z jednego końca komórki bakterii o długości 2 mm na drugi jej koniec w ciągu 1 sekundy. Czy te dwie liczby zgadzają się (załóżmy, że średnica grupy głowy lipidu wynosi ok. 0,5 nm)? Jeśli nie, czy można podać powód różnicy?

B. Aby docenić ogromną szybkość ruchu cząsteczek, przyjmijmy, że grupa głowy lipidu ma wielkość zbliżoną do piłeczki pingpongowej (4 cm średnicy) oraz że podłoga pokoju 6 × 6 m jest szczelnie pokryta tymi piłeczkami. Jeśli sąsiadujące ze sobą cząsteczki zmieniałyby pozycje raz na 10^{-7} sekundy, to jaka byłaby ich szybkość w kilometrach na godzinę? Ile czasu zajęłoby piłeczce przeniesienie się od jednej ściany pokoju do drugiej?

Pytanie 11-15. Dlaczego błona komórkowa erytrocytu potrzebuje białek?

Pytanie 11-16. Rozważmy białko transbłonowe, tworzące hydrofilowy por w błonie komórkowej komórki eukariotycznej, który — po zaktywowaniu w wyniku związania specyficznego liganda od strony zewnątrzkomórkowej — umożliwi wejście Na^+ do komórki. Białko to jest zbudowane z pięciu podobnych podjednostek transbłonowych, a każda z nich zawiera transbłonową α helisę z hydrofilowymi bocznymi łańcuchami aminokwasów na jednej powierzchni, a hydrofobowymi bocznymi łańcuchami aminokwasów na powierzchni przeciwnej. Wziąwszy pod uwagę działanie tego białka jako kanału jonowego, zaproponuj możliwe ustawienie w błonie pięciu α helis transbłonowych.

Pytanie 11-17. W błonie erytrocytu człowieka stosunek masy białek (przeciętna m. cz. 50 000) do masy fosfolipidów (m. cz. 800) i cholesterolu (m. cz. 386) wynosi ok. 2 : 1 : 1. Ile cząsteczek lipidów przypada na każdą cząsteczkę białka?

Pytanie 11-18. Narysuj schematyczny diagram przedstawiający widok z góry zejścia się dwóch błon komórkowych podczas fuzji komórek, tak jak pokazano to na rys. 11-35. Za-

znacz w obu komórkach białka błonowe, które zostały oznakowane od zewnątrz przez wiązanie cząsteczek przeciwciał z fluoryzującymi znacznikami o odmiennych barwach. Na rysunku należy zaznaczyć los tych kolorowych „metek” w trakcie fuzji i po niej. Czy w komórce hybrydowej będą one nadal tylko po stronie zewnętrznej: po fuzji komórek (a) i po wymieszaniu białek błonowych (b), które nastąpi podczas inkubacji w 37°C? Jak różniłby się wynik doświadczenia, gdyby inkubację przeprowadzono w 0°C?

Pytanie 11-19. Porównaj siły hydrofobowe utrzymujące białko błonowe w dwuwarstwie lipidowej z tymi, które pomagają przy fałdowaniu się białka w niepowtarzalną strukturę trójwymiarową.

12

Transport przez błony

- Stężenie jonów wewnątrz komórki jest bardzo różne od ich stężenia na zewnątrz

PRZENOŚNIKI I ICH FUNKCJE

- Cząsteczki i jony przechodzą poprzez błonę w drodze transportu biernego lub aktywnego
- Napędem transportu biernego mogą być zarówno siły elektryczne, jak i gradienty stężeń
- Transport aktywny przemieszcza jony i cząsteczki wbrew ich gradientom elektrochemicznym
- Do wypompowania Na^+ komórki zwierząt używają energię hydrolizy ATP
- Siłę napędową pompy Na^+-K^+ stanowi przejściowe dołączenie grupy fosforanowej
- Komórki zwierząt używają gradientu Na^+ do aktywnego pobierania substancji odżywczych
- Pompa Na^+-K^+ pomaga w utrzymaniu osmotycznej równowagi komórek zwierzęcych
- Wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} jest utrzymywane na niskim poziomie przez pompy Ca^{2+}
- Do zasilania transportu błonowego rośliny, grzyby i bakterie używają gradientów H^+

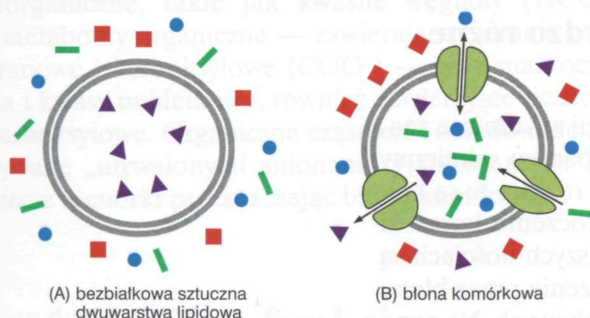
KANAŁY JONOWE I POTENCJAŁ BŁONOWY

- Kanały jonowe są jonowo selektywne i bramkowane
- Kanały jonowe przełączają się między stanem otwartym i zamkniętym w sposób przypadkowy
- Kanały jonowe bramkowane napięciem reagują na potencjał błonowy
- Potencjałem błonowym rządzi przepuszczalność błony dla specyficznych jonów

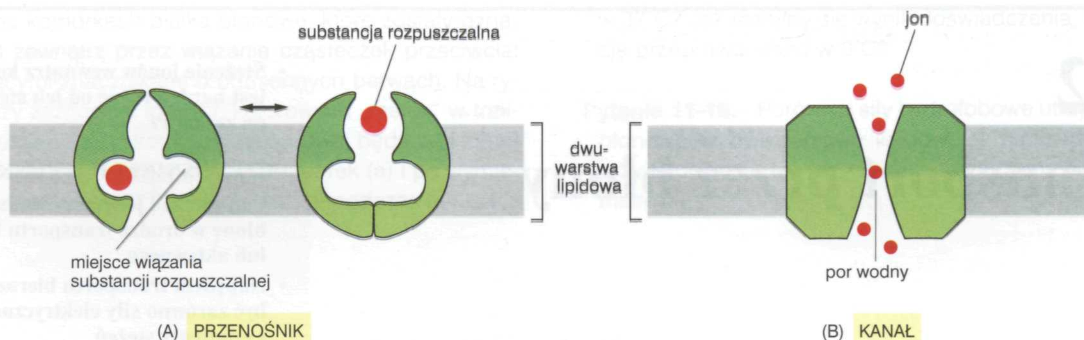
KANAŁY JONOWE I SYGNALIZACJA W KOMÓRKACH NERWOWYCH

- Potencjały czynnościowe umożliwiają szybkie komunikowanie się na duże odległości
- Potencjały czynnościowe są z reguły wynikiem działania kanałów Na^+ bramkowanych napięciem
- Kanały Ca^{2+} bramkowane napięciem zamieniają przy zakończeniach nerwowych sygnały elektryczne w sygnały chemiczne
- Kanały bramkowane przekaźnikiem nerwowym zamieniają w komórce docelowej sygnały chemiczne z powrotem w sygnały elektryczne
- Neurony otrzymują zarówno pobudzające, jak i hamujące impulsy
- Połączenia synaptyczne umożliwiają nam myślenie, działanie i pamiętanie

W rozdziale 11 podkreślono rolę pełnioną w komórce przez błony jako bariery: wnętrze dwuwarstwy lipidowej jest hydrofobowe i blokuje przejście prawie wszystkich cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie. Jednak komórki żyją i rosną dzięki ustawicznej wymianie cząsteczek ze swoim otoczeniem tak, iż różne cząsteczki rozpuszczalne w wodzie muszą przechodzić przez błonę komórkową: substancje odżywcze, takie jak cukry, aminokwasy, muszą być importowane, produkty zbędne, takie jak CO_2, muszą być usuwane, a wewnątrzkomórkowe stężenie jonów, takich jak H^+, Na^+, K^+, Ca^{2+}, musi być utrzymywane na określonym poziomie. Niektóre z tych *substancji rozpuszczalnych*, takie jak CO_2 i O_2, mogą przenikać przez dwuwarstwę lipidową w drodze prostej dyfuzji, ale ogromna ich większość tego nie potrafi (patrz rys. 11-20). Tak więc ich przenoszenie jest uzależnione od **transportu błonowego**, który jest prowadzony przez białka transbłonowe stanowiące specyficzne przejścia dla poszczególnych substancji (rys. 12-1). Na przykład pewne przejścia są otwarte dla Na^+, ale nie dla K^+, inne są otwarte dla K^+, ale nie dla Na^+, natomiast jeszcze inne są otwarte dla glukozy, ale nie dla aminokwasów. Zestaw białek trans-



Rys. 12-1. Białka transportu błonowego są odpowiedzialne za przenoszenie poprzez błonę małych cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie. Gdy pozbawione białek sztuczne dwuwarstwy lipidowe są nieprzepuszczalne dla większości cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie (A), to błony komórkowe mogą te cząsteczki przepuszczać (B). Należy zwrócić uwagę, że każdy typ białka transportującego w błonie komórkowej przenosi określony typ cząsteczek, co prowadzi do nagromadzenia się w przedziale zamkniętym błoną wyselekcjonowanego zestawu cząsteczek rozpuszczalnych



Rys. 12-2. Schematyczny obraz dwóch klas błonowych białek transportujących. Przy przenoszeniu poprzez dwuwarstwę lipidową małych cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie białko przenośnika ulega serii zmian konformacyjnych, natomiast białko kanałowe tworzy w poprzek dwuwarstwy lipidowej hydrofilowy por, przez który mogą dyfundować określone jony nieorganiczne. Jak należało oczekiwać, kanały prowadzą transport znacznie szybciej niż przenośniki. Kanały jonowe mogą istnieć w konformacji otwartej lub zamkniętej, ale transportują jony tylko w pokazanej na rysunku konformacji otwartej. Ich otwieranie i zamykanie jest zazwyczaj kontrolowane przez bodźce zewnętrzne lub przez warunki istniejące w komórce

portujących zawarty w błonie komórkowej czy w błonie organelli wewnątrzkomórkowych ściśle określa, jakie substancje mogą wejść do komórki lub organelli oraz z nich wyjść. Dlatego też każdy typ błony ma swój własny charakterystyczny zestaw białek transportujących.

Można rozróżnić dwie główne klasy błonowych białek transportujących. *Przenośniki* wiążą rozpuszczoną substancję po jednej stronie błony i przenoszą ją na drugą stronę poprzez zmianę konformacji przenośnika. Tą drogą mogą być transportowane zarówno małe cząsteczki organiczne, jak i nieorganiczne jony. Natomiast *kanały* tworzą w błonie małe hydrofilowe pory, przez które substancje mogą przechodzić w drodze dyfuzji (rys. 12-2). Większość kanałów białkowych przepuszcza tylko jony nieorganiczne i dlatego określa się je jako *kanały jonowe*. Komórki mogą wprawdzie przenosić selektywnie przez swe błony także makrocząsteczki, takie jak białka, ale wymaga to znacznie bardziej skomplikowanego mechanizmu, o którym będzie mowa w rozdz. 14.

W pierwszym podrozdziale omówimy przenośniki i ich działanie w transporcie substancji rozpuszczonych. W podrozdziale drugim zajmiemy się funkcją kanałów jonowych. Ponieważ jony mają ładunek elektryczny, ich przemieszczanie może wytworzyć znaczne siły elektryczne w poprzek błon. Siły te umożliwiają komórkom nerwowym przewodzenie sygnałów elektrycznych, o czym będziemy mówić w ostatnim podrozdziale.

Rozważania takie rozpoczniemy od omówienia różnic składu jonowego między wnętrzem komórki a jej otoczeniem. Pozwoli nam to wyjaśnić, dlaczego transport jonów, zarówno przez przenośniki, jak i kanały jonowe, ma tak zasadnicze znaczenie dla komórki.

Stężenie jonów wewnątrz komórki jest bardzo różne od ich stężenia na zewnątrz

Transport jonów poprzez błony komórkowe ma w biologii zasadnicze znaczenie. Komórki utrzymują wewnętrzny skład jonowy bardzo odmienny od tego, jaki istnieje w płynie otaczającym je, przy czym różnice te są kluczowe dla przeżycia i funkcjonowania komórek. W otoczeniu komórki substancjami rozpuszczonymi występującymi w największych ilościach są jony Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^- i H^+ (protony), a ich przechodzenie przez błonę komórkową stanowi istotną część wielu procesów komórkowych. Na przykład komórki zwierzęce pompują Na^+ na zewnątrz, aby utrzymać małe stężenie Na^+ w cytoplazmie. Pompowanie to pomaga w utrzymaniu równowagi ciśnień osmotycznych po obu stronach błony: jeśli ono zawiedzie, woda wpływa w drodze osmozy do komórki powodując jej pęcznienie i pęknięcie. Przemieszczanie jonów poprzez błony komórki pełni też zasadniczą rolę w działaniu komórki nerwowej, o czym będziemy mówić później, oraz w wytwarzaniu ATP przez wszystkie komórki, co omówimy w rozdz. 13.

Tabela 12-1. Porównanie stężeń jonów na zewnątrz i wewnątrz typowej komórki ssaka

Składnik	Stężenie wewnątrzkomórkowe (mM)	Stężenie zewnątrzkomórkowe (mM)
Kationy		
Na^+	5–15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}*	0,5	1–2
Ca^{2+}*	10^{-4}	1–2
H^+	$7 \cdot 10^{-5}$ ($10^{-7,2}$ M, czyli pH 7,2)	$4 \cdot 10^{-5}$ ($10^{-7,4}$ M, czyli pH 7,4)
Aniony		
Cl^-	5–15	110
aniony utrwalone**	duże	0

*Stężenia Ca^{2+} i Mg^{2+} podano dla wolnych jonów w cytozolu. W komórkach całkowite stężenie tych metali wynosi ok. 20 mM Mg^{2+} i 1–2 mM Ca^{2+}, ale większość z nich jest związana z białkami i innymi związkami, nie mogąc opuścić komórki. Znaczna część całkowitego Ca^{2+} w jest komórce zmagazynowana w różnych organellach.

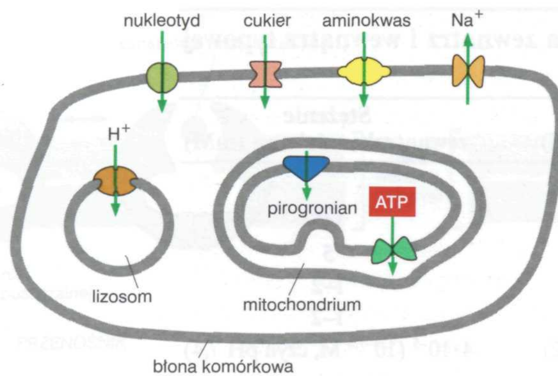
**Aniony utrwalone — to ujemnie naładowane małe i duże cząsteczki organiczne, uwięzione w komórce z powodu ich niezdolności przejścia przez błonę komórkową.

Stężenia jonów wewnątrz typowej komórki ssaka i w jej otoczeniu przedstawiono w tab. 12-1. Na^+ jest najliczniejszym dodatnio naładowanym jonem (kationem) obecnym na zewnątrz komórki, natomiast K^+ jest jonem najliczniej występującym w jej wnętrzu. Jeśli komórka ma nie być rozerwana przez siły elektryczne, ilość ładunków dodatnich wewnątrz komórki musi być zrównoważona przez prawie równą ilość ładunków ujemnych, przy czym to samo dotyczy ładunków w płynie otaczającym komórkę. (Mały nadmiar dodatnich lub ujemnych ładunków, zagęszczonych w sąsiedztwie błony komórkowej jest dopuszczalny i pełni ważne funkcje elektryczne, o czym będziemy mówić później).

Duże stężenie Na^+ na zewnątrz komórki jest zrównoważone głównie przez zewnątrzkomórkowe jony Cl^-. Duże stężenie K^+ wewnątrz komórki jest zrównoważone przez cały zestaw ujemnie naładowanych jonów (anionów) wewnątrzkomórkowych. Istotnie, większość związków wewnątrzkomórkowych ma ładunek ujemny: poza Cl^-, komórki zawierają jony nieorganiczne, takie jak kwaśne węglany (HCO_3^-), fosforany (PO_4^{3-}), metabolity organiczne — zawierające ujemnie naładowane grupy fosforanowe i karboksylowe (COO^-) — oraz makrocząsteczki, takie jak białka i kwasy nukleinowe, również zawierające liczne grupy fosforanowe i karboksylowe. Organiczne cząsteczki naładowane ujemnie są czasem nazywane „utrwalonymi anionami" („fixed anions"), ponieważ nie mogą uciec z komórki przekraczając błonę komórkową.

Przenośniki i ich funkcje

Przenośniki są białkami błonowymi niezbędnymi do przenoszenia poprzez błony prawie wszystkich małych cząsteczek organicznych z wyjątkiem cząsteczek rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych oraz małych cząsteczek nie naładowanych, które mogą przechodzić przez dwuwarstwę lipidową w drodze *dyfuzji prostej*. Każdy przenośnik jest wysoce selektywny i często transportuje tylko jeden typ cząsteczek. Aby nadać impuls i zapewnić poprawny, złożony ruch drobnych cząsteczek, zarówno

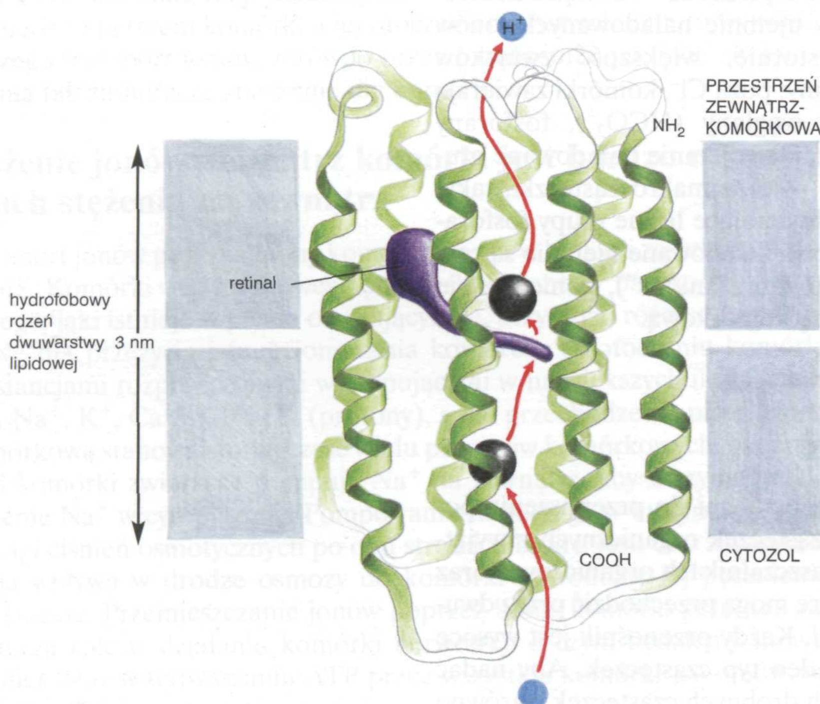


Rys. 12-3. Przykłady substancji transportowanej przez białka transportujące poprzez błonę komórkową. Każda błona komórkowa ma swój własny charakterystyczny zestaw białek transportujących

wchodzących do komórki, jak i z niej wychodzących oraz przemieszczanych pomiędzy cytozolem a różnymi organellami komórki, każda błona w komórce zawiera charakterystyczny dla siebie zestaw przenośników. Tak więc w błonie komórkowej znajdują się przenośniki importujące substancje odżywcze, takie jak cukry, aminokwasy i nukleotydy; w wewnętrznej błonie mitochondrialnej znajdują się przenośniki do importu pirogronianu (w komórkach roślinnych także: jabłczanu i szczawiooctanu — *przyp. tłum.*) i ADP oraz eksportu ATP itd. (rys. 12-3).

Jak omówiono to w rozdz. 11, łańcuchy polipeptydowe przebadanych szczegółowo białek prowadzących transport przez błonę — zarówno przenośników, jak i kanałów — wielokrotnie przechodzą przez dwuwarstwę lipidową (patrz rys. 11-29). Uważa się, że przechodząc wielokrotnie tam i z powrotem przez dwuwarstwę, łańcuch polipeptydowy tworzy wyścielone białkiem ciągłe przejście, pozwalające wybranym małym cząsteczkom hydrofilowym na przechodzenie poprzez błonę bez wejścia w bezpośredni kontakt z hydrofobowym wnętrzem dwuwarstwy lipidowej (rys. 12-4).

Zasadniczą różnicą między przenośnikiem a kanałem jest sposób, w jaki rozróżniają one rozpuszczone cząsteczki, transportując tylko pewne z nich, a nie inne. Kanały prowadzą to rozróżnienie na zasadzie ich wiel-



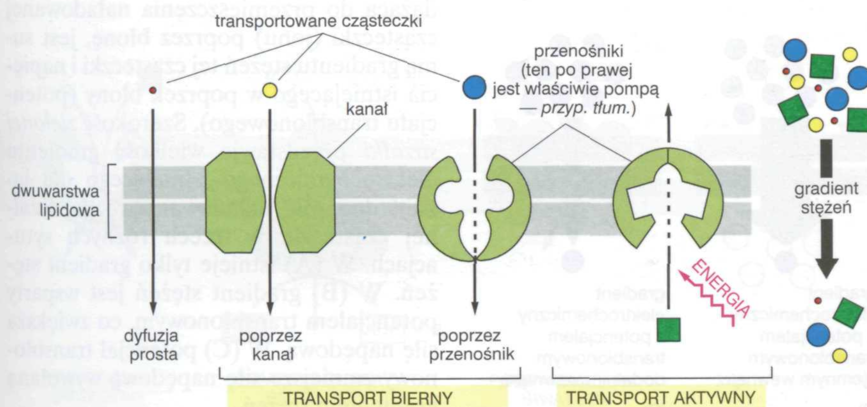
Rys. 12-4. Trójwymiarowa struktura białka transportującego. Białkiem tym jest bakteriorodopsyna, o której mówiono w rozdz. 11 (patrz s. 361–363). Jest ona jednym z nielicznych błonowych białek transportujących, których szczegółowa trójwymiarowa struktura jest znana. Pompuje ona H^+ (protony) z bakterii *Hallobacterium halobium* na zewnątrz w odpowiedzi na światło, które zostaje pochłonięte przez przyłączoną kowalencyjnie grupę (chromofor), zaznaczoną kolorem *fioletowym*. Łańcuch polipeptydowy przechodzi poprzez dwuwarstwę lipidową w układzie siedmiu α helis. Należy zwrócić uwagę, że droga, którą przechodzą protony (*czerwone strzałki*), pozwala im uniknąć kontaktu z dwuwarstwą lipidową. (Zaadaptowano z: R. Henderson et al. *J. Mol. Biol.* 213: 899–929, 1990)

kości i ładunku elektrycznego: gdy kanał jest otwarty, cząsteczki dostatecznie małe i niosące odpowiedni ładunek mogą się prześlizgnąć jak przez wąskie, otwarte drzwi zapadkowe. Przenośnik działa bardziej jak jednokierunkowe drzwi obrotowe: pozwala wejść tylko tej cząsteczce, która pasuje do miejsca wiążącego na białku przenośnika i przenosi te cząsteczki poprzez błonę tylko pojedynczo, za każdym razem zmieniając swą konformację (patrz rys. 12-12A). Przenośnik specyficznie wiąże przenoszoną cząsteczkę w ten sam sposób, w jaki enzym wiąże swój substrat i to właśnie wymóg specyficznego wiązania nadaje transportowi selektywność. Aby całkowicie zrozumieć sposób, w jaki przenośnik przeprowadza cząsteczkę poprzez błonę, musielibyśmy znać szczegóły jego trójwymiarowej struktury, ale taka informacja istnieje na razie tylko w stosunku do nielicznych białek czynnych w transporcie przez błony. Jednym z nich jest bakteriorodopsyna (patrz rys. 12-4), która działa jak aktywowana światłem pompa protonowa, o czym mówiono w rozdz. 11. Niemniej jednak ogólne zasady leżące u podstaw transportowej funkcji przenośników rozumiemy już dobrze.

Cząsteczki i jony przechodzą poprzez błonę w drodze transportu biernego lub aktywnego

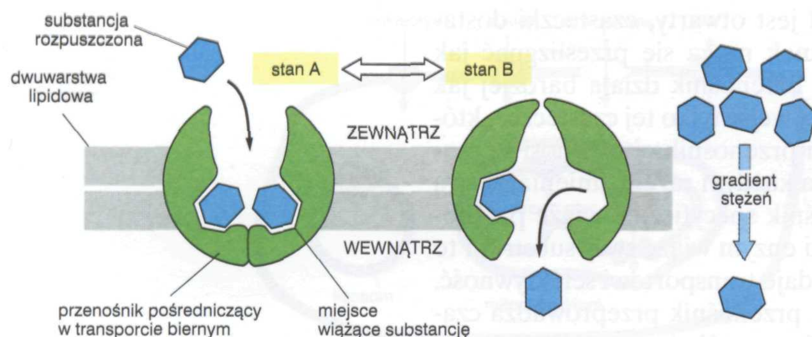
Przy rozważaniu transportu ważnym pytaniem jest powód, dla którego zachodzi on w danym, a nie w innym kierunku. Jeśli tylko istnieje odpowiednia droga, przechodzenie cząsteczek z rejonów o ich dużym stężeniu do rejonów o małym stężeniu jest korzystne energetycznie, a więc przebiega spontanicznie. Taki ruch określamy jako *bierny*, ponieważ nie wymaga żadnej innej siły napędowej. Jeśli na przykład rozpuszczona substancja występuje poza komórką w stężeniu większym niż w komórce i gdy w błonie komórkowej jest obecny odpowiedni kanał lub przenośnik, substancja ta będzie spontanicznie przechodzić przez błonę do komórki w drodze **transportu biernego** (nazywanego też dyfuzją ułatwioną), bez wydatku energii ze strony transportującego białka.

Jednakże, aby przesunąć cząsteczkę lub jon wbrew gradientowi stężeń, transportujące białko musi wykonać pracę. Musi ono pokonać różnicę stężeń przez sprzężenie przenoszenia danych cząsteczek lub jonów z innymi procesami, które dostarczą energii (tak jak omówiono to w rozdz. 3, w przypadku reakcji enzymatycznych). Prowadzone tą drogą przemieszczanie poprzez błonę określa się jako **transport aktywny**; jest on dokonywany tylko przez specjalne typy przenośników, które mogą do procesu transportu zaprząc określone źródła energii (rys. 12-5).



Rys. 12-5. Porównanie transportu biernego i aktywnego. Jeśli nie naładowane cząsteczki rozpuszczalne w wodzie są dostatecznie małe, mogą przemieszczać się zgodnie ze swoimi gradientami stężeń — bezpośrednio przez dwuwarstwę lipidową, w drodze prostej dyfuzji. Przykładem są: etanol, dwutlenek węgla i tlen. Jednakże większość substancji rozpuszczalnych w wodzie może przechodzić poprzez błony tylko wtedy, gdy są obecne błonowe białka transportujące (przenośnik lub kanał), które dokonają tego przeniesienia. Jak wskazano na rysunku, transport bierny przebiegający w kierunku zgodnym z gradientem stężeń zachodzi spontanicznie, natomiast transport wbrew gradientowi stężeń (aktywny) wymaga doprowadzenia energii. Tylko przenośnik może prowadzić transport aktywny, ale transport bierny może być prowadzony zarówno przez przenośnik, jak i przez kanał *

* Autor wprowadza tu swoistą interpretację przenośników, do których zalicza również pompy. Na tym rysunku zachowano ten sposób myślenia, chociaż w tekście tłumacz podtrzymuje, stosowane przez większość autorów, potraktowanie pomp jako klasy odrębnej od przenośników (*przyp. tłum.*).

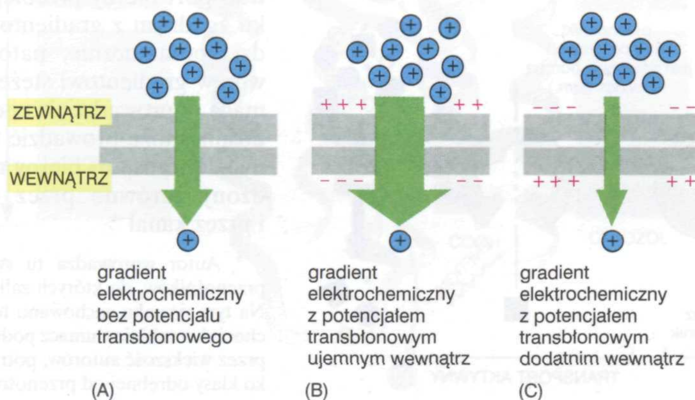


Rys. 12-6. Hipotetyczny model zmian konformacyjnych, które mogłyby pośredniczyć w biernym transporcie takich substancji rozpuszczalnych, jak glukoza. Białko przenośnika istnieje w dwóch stanach konformacyjnych: w stanie A miejsca wiążące dla przenoszonej substancji są wystawione na zewnętrzną stronę błony; w stanie B te same miejsca są eksponowane po drugiej stronie błony. Zakłada się, że przejście między tymi dwoma stanami zachodzi przypadkowo i niezależnie od związania przenoszonej substancji oraz że przejścia są całkowicie odwracalne. Jeśli stężenie przenoszonej substancji jest większe po zewnętrznej stronie błony, substancja ta będzie częściej wychwytywana podczas przejść A → B, które wprowadzają ją do komórki, niż podczas przejść B → A, które wyprowadzą ją z komórki. W ten sposób dojdzie do przetransportowania netto substancji zgodnie z gradientem jej stężeń

Napędem transportu biernego mogą być zarówno siły elektryczne, jak i gradienty stężeń

Prostym przykładem przenośnika pośredniczącego w transporcie biernym jest *przenośnik glukozy* obecny w błonie komórkowej komórek wątroby ssaków, a także wielu innych typów komórek. Buduje go łańcuch białkowy o 12 helisach transbłonowych. Uważa się, że białko to może przyjmować przynajmniej dwie konformacje, między którymi oscyluje odwracalnie i przypadkowo. W jednej konformacji przenośnik eksponuje miejsca wiążące glukozę na zewnątrz komórki, a w drugiej eksponuje je do wnętrza komórki (rys. 12-6).

Gdy na zewnątrz komórki wątroby jest dużo glukozy (np. po posiłku), jej cząsteczki wiążą się do wystawionych na zewnątrz miejsc wiążących; gdy białko zmienia swą konformację, wprowadza te cząsteczki do wnętrza i uwalania je do cytozolu, gdzie stężenie glukozy jest małe. Odwrotnie, gdy poziom cukru we krwi jest niski (gdy jest się głodnym), hormon glukagon stymuluje komórkę wątroby do wytwarzania dużej ilości glukozy w drodze rozkładu glikogenu. W konsekwencji stężenie glukozy w komórce staje się większe niż na zewnątrz, a glukoza wiąże się do tych miejsc na przenośniku, które są eksponowane do wnętrza komórki; gdy białko zmieni swą konformację na przeciwną, glukoza zostaje wyprowadzona z komórki. Przepływ glukozy może następować w którymkolwiek kierunku, ale zgodnie z *gradientem stężenia* glukozy istniejącym poprzez błonę — do środka, jeśli więcej glukozy jest na zewnątrz komórki i na zewnątrz, jeśli sytuacja jest odwrotna. To właśnie tego typu białka transportujące, które umożliwiają przepływ substancji, ale nie biorą udziału w określeniu jego kierunku, prowadzą transport bierny. Chociaż bierny, transport ten jest jednak bardzo selektywny. Miejsca wiążące na przenośniku glukozy wiążą tylko D-glukozę, lecz nie, na przykład, jej zwierciadlane odbicie —



Rys. 12-7. Dwie składowe gradientu elektrochemicznego. Wypadkowa siła napędowa (gradient elektrochemiczny), dążąca do przemieszczenia naładowanej cząsteczki (jonu) poprzez błonę, jest sumą gradientu stężeń tej cząsteczki i napięcia istniejącego w poprzek błony (potencjału transbłonowego). Szerokość *zielonej strzałki* przedstawia wielkość gradientu elektrochemicznego istniejącego dla jakiejś dodatnio naładowanej rozpuszczalnej cząsteczki w trzech różnych sytuacjach. W (A) istnieje tylko gradient stężeń. W (B) gradient stężeń jest wsparty potencjałem transbłonowym, co zwiększa siłę napędową. W (C) potencjał transbłonowy zmniejsza siłę napędową wywołaną gradientem stężeń

L-glukozę, której komórki nie mogą używać do glikolizy. O kierunku biernego transportu glukozy, która jest cząsteczką nie naładowaną, decyduje po prostu gradient jej stężenia. W przypadku cząsteczek naładowanych elektrycznie, zarówno małych jonów organicznych, jak i nieorganicznych, w grę wchodzi dodatkowa siła. Z powodów, które objaśnimy później, w poprzek większości błon komórkowych występuje różnica potencjałów, określana jako *potencjał transbłonowy*. Działa on z określoną siłą na każdą cząsteczkę, która niesie ładunek elektryczny. Cytoplazmatyczna powierzchnia błony komórkowej ma zazwyczaj potencjał ujemny względem otoczenia komórki, a to powoduje tendencję do wprowadzania dodatnio naładowanych jonów lub cząsteczek do komórki, a wyprowadzania z niej jonów lub cząsteczek naładowanych ujemnie. Równocześnie jednak cząsteczki te będą miały tendencję do przemieszczania się w dół ich gradientu stężenia.

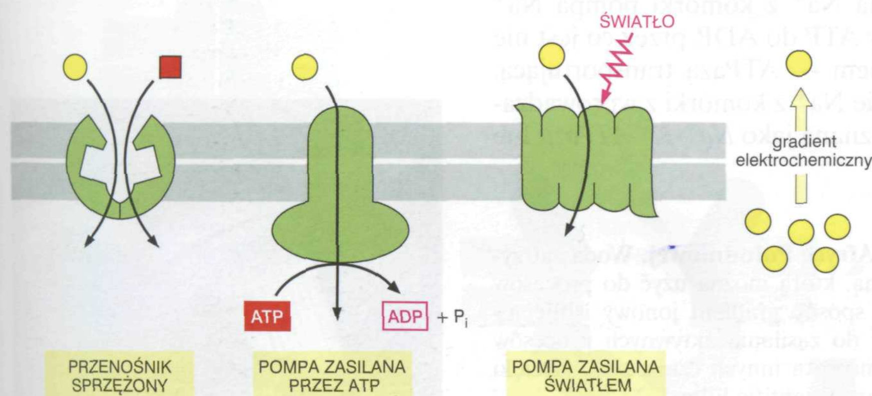
Wypadkowa siła kierująca poprzez błonę jony lub naładowane cząsteczki składa się więc z dwóch sił składowych, z których jedna wynika z gradientu stężenia, a druga z napięcia istniejącego poprzez błonę. Tę wypadkową siłę określa się jako **gradient elektrochemiczny** dla danej przenoszonej jednostki. Ten właśnie gradient determinuje kierunek biernego transportu przez błonę. Dla pewnych jonów napięcie i gradient stężenia działają w tym samym kierunku, tworząc względnie stromy gradient elektrochemiczny (rys. 12-7B). Tak jest na przykład w przypadku Na^+, który jest naładowany dodatnio i którego stężenie jest większe na zewnątrz komórki niż w jej wnętrzu. Dlatego też, gdy tylko Na^+ ma takie możliwości, będzie dążył do wejścia do komórki. Gdy napięcie i gradienty stężeń mają efekt przeciwstawny, wypadkowy gradient elektrochemiczny może być mały (rys. 12-7C). Przykładem jest tu K^+, jon naładowany dodatnio, którego stężenie wewnątrz komórki jest znacznie większe niż na zewnątrz. Właśnie z powodu przeciwstawnych efektów K^+ ma mały gradient elektrochemiczny poprzez błonę, mimo jego dużego gradientu stężenia i dlatego wypadkowe przemieszczanie K^+ przez błonę jest niewielkie.

Pytanie 12-1. Prostą reakcję enzymatyczną można opisać równaniem $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$, gdzie E jest enzymem, S substratem, P produktem, a ES kompleksem enzym–substrat.

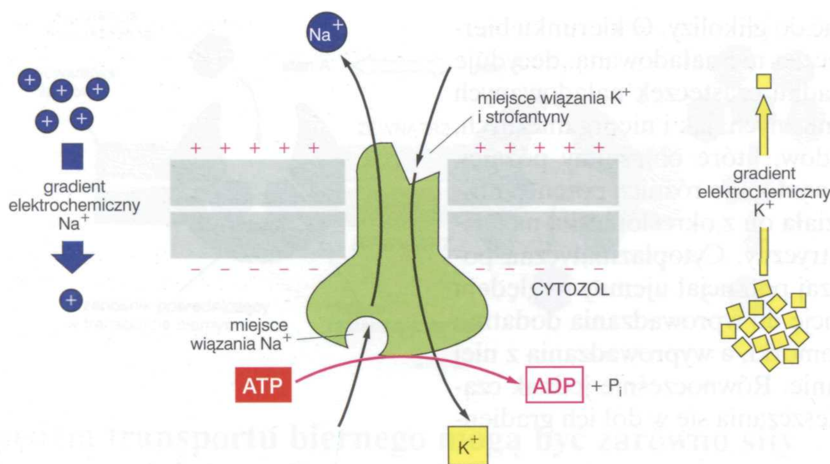
A. Napisz porównywalne równanie opisujące działanie przenośnika (P), który prowadzi transport rozpuszczonej substancji (S) zgodnie z gradientem jej stężenia.
B. Co takie równanie może powiedzieć o funkcji przenośnika białkowego?
C. Dlaczego takie równanie będzie niewłaściwe dla opisu funkcji kanału?

Transport aktywny przemieszcza jony i cząsteczki wbrew ich gradientom elektrochemicznym

Komórki nie mogą polegać jedynie na transporcie biernym. Do zachowania wewnątrzkomórkowego składu jonowego komórek i do wprowadzania cząsteczek, których stężenie na zewnątrz jest mniejsze niż w komórce, niezbędny jest aktywny transport cząsteczek i jonów wbrew ich gradientowi elektrochemicznemu. Istnieją trzy główne drogi, którymi komórki prowadzą transport aktywny (rys. 12-8): 1) *przenośniki sprzężone* sprzęgają



Rys. 12-8. Trzy drogi zasilania transportu aktywnego. Cząsteczkę transportowaną aktywnie zaznaczono kolorem *żółtym*, a źródło energii kolorem *czerwonym*. (Ten rysunek nie uwzględnia orientacji błony względem przedziałów i przez to może być mylący. Na przykład dla pompy zasilanej przez ATP strona cytozolowa jest poniżej błony (a jonem pompowanym może być tylko K^+ — patrz rys. 12-9). To samo dotyczy przenośnika sprzężonego. Natomiast dla pompy zasilanej światłem poniżej błony jest strona pozacytozolowa (otoczenie bakterii lub wnętrze tylakoidu — *przyp. tłum.*).



Rys. 12-9. Pompa Na^+-K^+. To białko transportujące używa energię hydrolizy ATP do pompowania Na^+ na zewnątrz komórki i K^+ do jej wnętrza, przenosząc oba jony wbrew ich gradientom elektrochemicznym. Strofantyna jest środkiem farmakologicznym, który wiąże się z pompą i hamuje jej aktywność przez uniemożliwienie związania K^+.

transport przez błonę jednej cząsteczki, zachodzący wbrew gradientowi, z transportem innej, zgodnym z gradientem; 2) *pompy napędzane przez ATP* sprzęgają transport wbrew gradientowi z hydrolizą ATP; 3) *pompy napędzane światłem*, znajdowane głównie w komórkach bakteryjnych, sprzęgają transport wbrew gradientowi z wprowadzeniem energii ze światła, o czym wspomniano już mówiąc o bakteriorodopsynie.

Ponieważ substancja, która ma się przemieszczać zgodnie z gradientem, musi być uprzednio przetransportowana wbrew gradientowi, niezbędne jest powiązanie różnych form aktywnego transportu. Tak więc, w błonie komórkowej komórek zwierząt pompy napędzane przez ATP wyprowadzają z komórki Na^+ wbrew jego gradientowi elektrochemicznemu, a następnie Na^+ wpływa do komórek z powrotem już zgodnie z tym gradientem. Ponieważ Na^+ wpływa do cytozolu poprzez przenośniki sprzężone z Na^+, jego napływ stanowi napęd do aktywnego przemieszczenia wielu innych substancji do komórki wbrew ich gradientom elektrochemicznym. Gdyby pompa Na^+ przestała działać, gradient Na^+ prędko by się wyrównał, a transport poprzez przenośniki sprzężone z Na^+ uległby zatrzymaniu. Dlatego też napędzana przez ATP pompa Na^+ odgrywa centralną rolę w transporcie poprzez błony w komórkach zwierząt. W komórkach roślin, grzybów i wielu bakterii podobną rolę odgrywają napędzane przez ATP pompy, które wytwarzają protonowy gradient elektrochemiczny przez wypompowywanie H^+ z komórki, o czym będzie mowa później.

Do wypompowania Na^+ komórki zwierząt używają energię hydrolizy ATP

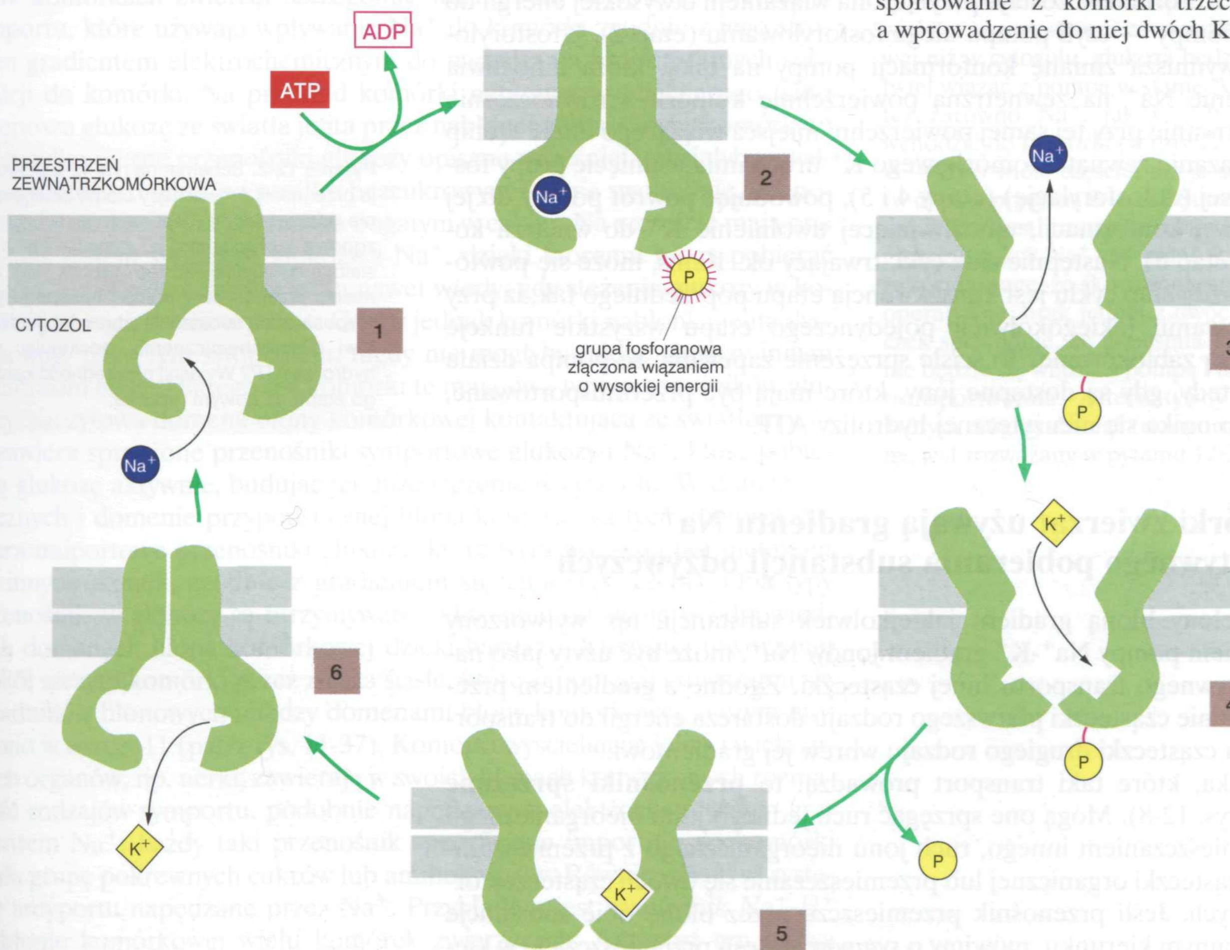
Energię potrzebną do wytransportowania Na^+ z komórki pompa Na^+ w komórkach zwierząt czerpie z hydrolizy ATP do ADP, przez co jest nie tylko przenośnikiem, ale również enzymem — ATPazą transportującą. Równocześnie sprzęga ona wyprowadzanie Na^+ z komórki z wprowadzaniem do niej K^+. Dlatego też pompa jest znana jako *Na^+-K^+ ATPaza* lub **pompa Na^+-K^+** (rys. 12-9).



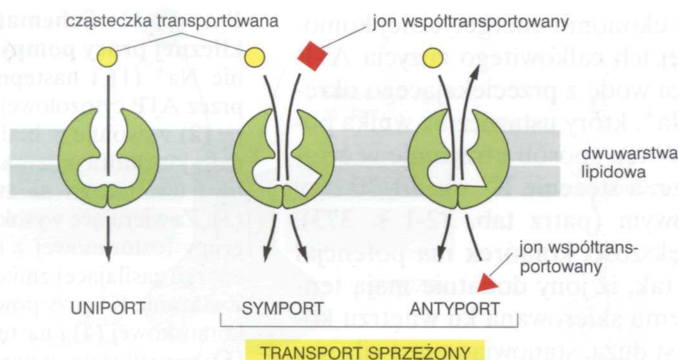
Rys. 12-10. Tama rzeki Blide w Afryce Południowej. Woda zatrzymana tamą ma energię potencjalną, którą można użyć do procesów sterowanych energią. W ten sam sposób gradient jonowy istniejący w poprzek błony może być użyty do zasilania aktywnych procesów w komórce, w tym aktywnego transportu innych cząsteczek. (Dzięki uprzejmości: Paul Franklin © Oxford Scientific Films)

Pompa ta zajmuje centralną pozycję w ekonomii energetycznej komórek zwierząt pochłaniając 30% lub więcej ich całkowitego zużycia ATP. Tak jak stale pracująca pompa wybierająca wodę z przeciekającego okrętu, operuje ona bez przerwy wyrzucając Na^+, który ustawicznie wnika poprzez inne przenośniki i kanały jonowe. W ten sposób utrzymuje w cytozolu stężenie Na^+ ok. 10–30 razy mniejsze, a stężenie K^+ ok. 10–30 razy większe niż w płynie zewnątrzkomórkowym (patrz tab. 12-1 s. 373). W prawidłowych warunkach wnętrze większości komórek ma potencjał elektryczny ujemny względem otoczenia tak, iż jony dodatnie mają tendencję do wnikania do komórki; dzięki temu skierowana ku wnętrzu komórki elektrochemiczna siła napędowa jest duża, stanowiąc sumę siły wywołanej gradientem stężenia i skierowanej w tym samym kierunku siły wywołanej gradientem napięcia (patrz rys. 12-7B). Jony Na^+ na zewnątrz komórki, po wyższej stronie swego gradientu elektrochemicznego, przypominają ogromną objętość wody zatrzymanej przez wysoką tamę tym, że stanowią bardzo duży zapas energii (rys. 12-10). Nawet gdyby zatrzymano działanie pompy Na^+-K^+ toksyną, jaką jest glikozyd roślinny *strofantyna* (ang. ouabain), która łączy się z pompą i zapobiega wiązaniu K^+ (patrz rys. 12-9), zapas energii jest dostatecznie duży, aby przez wiele minut podtrzymać inne procesy transportowe napędzane przez wpływanie Na^+ zgodnie z gradientem.

Dla K^+ sytuacja jest odmienna. Siła elektryczna jest ta sama jak ta, która działa na Na^+, ponieważ zależy ona tylko od ładunku niesionego przez jon. Jednakże gradient stężenia działa w kierunku przeciwnym. W prawidłowych warunkach wynikiem jest to, że wypadkowa siła napędzająca



Rys. 12-11. Schematyczny model cyklicznej pracy pompy Na^+-K^+. Związanie Na^+ (1) i następne ufosforylowanie przez ATP cytozolowej powierzchni pompy (2) wywołuje w białku zmianę konformacyjną, która przenosi Na^+ poprzez błonę i uwalnia go na stronie zewnętrznej (3). Zawierające wysoką energię wiązanie grupy fosforanowej z białkiem dostarcza energii zasilającej zmianę konformacyjną. Związanie K^+ przy powierzchni zewnątrzkomórkowej (4) i następna defosforylacja (5) umożliwiają powrót białka do jego wyjściowej konformacji, co powoduje przeniesienie K^+ poprzez błonę i uwolnienie go do cytozolu (6). Te zmiany konformacji są analogiczne do przejść A ⇌ B pokazanych na rys. 12-6 z tym wyjątkiem, że w obecnym przypadku zależna od Na^+ fosforylacja i zależna od K^+ defosforylacja białka powodują wystąpienie zmian konformacyjnych w sposób uporządkowany, co umożliwia białku wykonanie użytecznej pracy. Dla uproszczenia pokazano tylko po jednym miejscu wiążącym dla Na^+ i K^+. Uważa się, że w rzeczywistej pompie komórek ssaków istnieją trzy miejsca wiążące Na^+ i dwa miejsca wiążące K^+. Dlatego też wynikiem netto jednego cyklu pracy pompy jest wytransportowanie z komórki trzech Na^+, a wprowadzenie do niej dwóch K^+



Rys. 12-12. Trzy typy transportu prowadzonego przez przenośniki. Pewne przenośniki transportują poprzez błonę pojedyncze cząsteczki (uniport). Natomiast w transporcie sprzężonym przeniesienie jednej cząsteczki zależy od równoczesnego lub sekwencyjnego przeniesienia innej cząsteczki i to albo w tym samym kierunku (symport), albo w kierunkach przeciwnych (antyport). Systemy uniportu, symportu i antyportu są stosowane zarówno w transporcie biernym, jak i aktywnym

przemieszczanie K^+ poprzez błonę jest bliska zeru, ponieważ siła elektryczna wpychająca K^+ do komórki jest prawie całkowicie zrównoważona przez gradient stężenia dążący do wyprowadzenia tego jonu z komórki.

Siłę napędową pompy Na^+-K^+ stanowi przejściowe dołączenie grupy fosforanowej

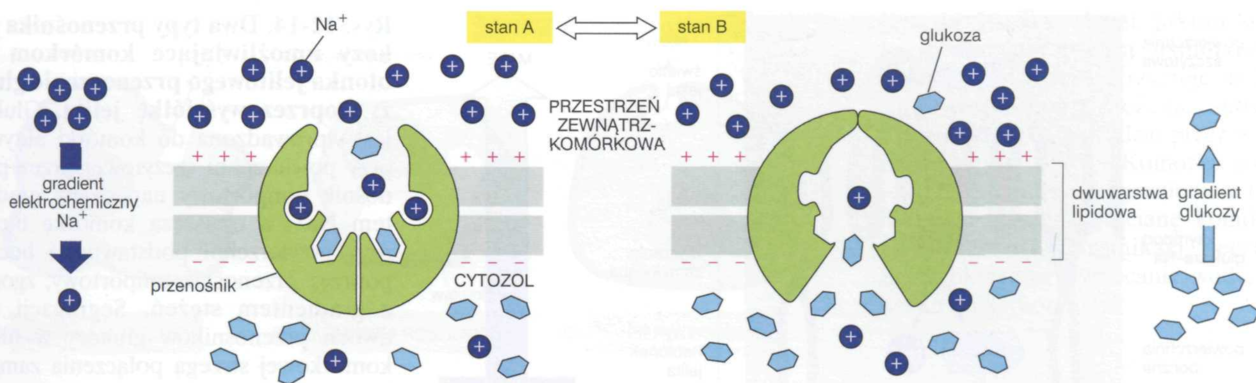
Pompa Na^+-K^+ stanowi doskonałą ilustrację tego, jak białko sprzęga jedną reakcję z drugą, na podstawie zasad omówionych w rozdz. 3. Pompa pracuje cyklicznie, co przedstawiono schematycznie na rys. 12-11. Na^+ wiąże się pompą w miejscach eksponowanych do cytozolu (etap 1), inicjując aktywność ATPazową. ATP ulega rozszczepieniu z uwolnieniem ADP, a grupa fosforanowa zostaje przyłączona wiązaniem o wysokiej energii do białka pompy — czyli pompa ulega fosforylowaniu (etap 2). Ufosforylowanie wymusza zmianę konformacji pompy na taką, która umożliwia uwolnienie Na^+ na zewnętrzną powierzchnię komórki i równocześnie eksponowanie przy tej samej powierzchni miejsca wiążącego dla K^+ (etap 3). Związanie zewnątrzkomórkowego K^+ uruchamia usunięcie grupy fosforanowej (defosforylację) (etapy 4 i 5), powodując powrót pompy do jej wyjściowej konformacji, umożliwiającej uwolnienie K^+ do wnętrza komórki (etap 6). Następnie cały cykl, trwający ok. 10 ms, może się powtórzyć. Każdy etap cyklu jest konsekwencją etapu poprzedniego tak, iż przy zahamowaniu jakiegokolwiek pojedynczego etapu wszystkie funkcje pompy są zablokowane. To ścisłe sprzężenie zapewnia, że pompa działa tylko wtedy, gdy są dostępne jony, które mają być przetransportowane, przez co unika się nieużytecznej hydrolizy ATP.

Pytanie 12-2. Schemat na rys. 12-6 pokazuje przenośnik prowadzący bierne przenoszenie poprzez błonę rozpuszczonej substancji zgodnie z gradientem jej stężenia. Jak musiałbyś zmodyfikować ten rysunek, aby zamienić przenośnik w pompę transportującą rozpuszczoną substancję wbrew jej gradientowi elektrochemicznemu, posługując się hydrolizą ATP? Wyjaśnij niezbędność każdego etapu na nowym rysunku.

Komórki zwierząt używają gradientu Na^+ do aktywnego pobierania substancji odżywczych

Rozdzielony błoną gradient jakiejkolwiek substancji, np. wytworzony działaniem pompy Na^+-K^+ gradient jonów Na^+, może być użyty jako napęd aktywnego transportu innej cząsteczki. Zgodne z gradientem przemieszczanie cząsteczki pierwszego rodzaju dostarcza energii do transportowania cząsteczki drugiego rodzaju wbrew jej gradientowi.

Białka, które taki transport prowadzą, to **przenośniki sprzężone** (patrz rys. 12-8). Mogą one sprzęgać ruch jednego jonu nieorganicznego z przemieszczaniem innego, ruch jonu nieorganicznego z przemieszczaniem cząsteczki organicznej lub przemieszczanie się dwóch cząsteczek organicznych. Jeśli przenośnik przemieszcza przez błonę obie substancje w tym samym kierunku, mówimy o *symporcie*. Jeśli przemieszcza je w kie-

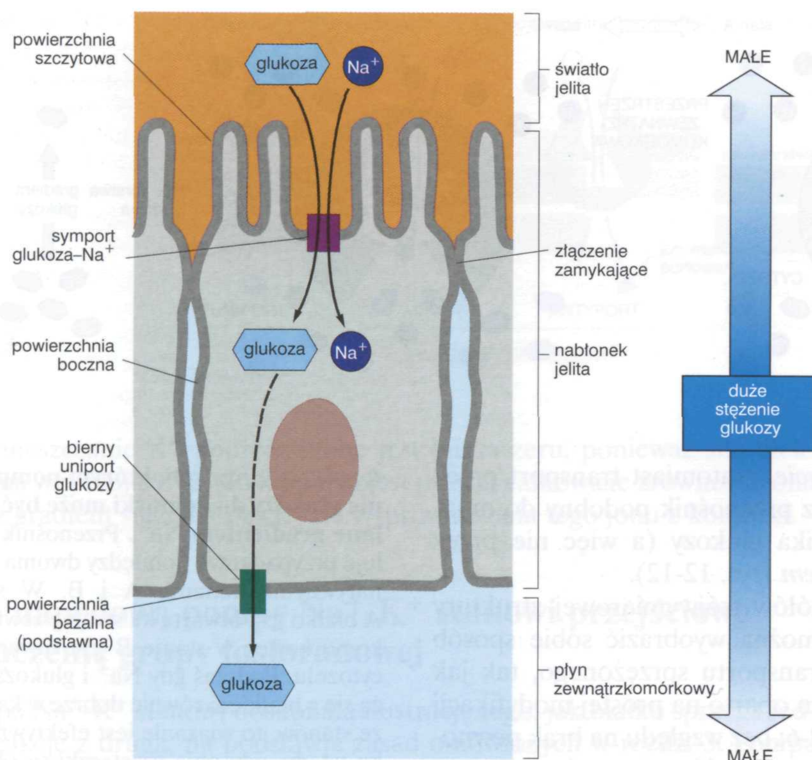


Rys. 12-13. Sposób, którym pompowanie glukozy do komórki może być zasilane gradientem Na^+. Przenośnik oscyluje przypadkowo pomiędzy dwoma alternatywnymi stanami, A i B. W stanie A białko jest otwarte ku stronie zewnątrzkomórkowej; w stanie B jest otwarte do cytozolu. Podczas gdy Na^+ i glukoza wiążą się z białkiem równie dobrze w każdym ze stanów, to wiązanie jest efektywne tylko wtedy, gdy obie cząsteczki są obecne razem: związanie Na^+ indukuje w białku zmianę konformacyjną, która znacznie zwiększa powinowactwo białka do glukozy i odwrotnie. Ponieważ stężenie Na^+ jest większe w przestrzeni zewnątrzkomórkowej niż w cytozolu, glukoza będzie się łatwiej wiązać z pompą w stanie A; dlatego też zarówno Na^+, jak i glukoza będą wchodzić do komórki (w drodze przejścia A → B) o wiele częściej niż ją opuszczać (w drodze przejścia B → A). Sumarycznym wynikiem jest transport netto zarówno glukozy, jak i Na^+ do komórki. Należy zwrócić uwagę, że skoro wiązanie jest kooperatywne, brak jednej z dwóch cząsteczek spowoduje, że pozostała cząsteczka nie będzie się wiązać z pompą i nie będzie transportowana. Alternatywny sposób, którym mógłby działać transport sprzężony, jest rozważany w pytaniu 12-3

runkach przeciwnych, mówimy o *antyporcie*. Natomiast transport przez błonę tylko jednego typu substancji przez przenośnik podobny do omawianego poprzednio biernego przenośnika glukozy (a więc nie przez przenośnik sprzężony) nazywamy *uniportem* (rys. 12-12).

Aczkolwiek nie znamy jeszcze szczegółów trójwymiarowej struktury żadnego z przenośników sprzężonych, można wyobrazić sobie sposób działania molekularnego mechanizmu transportu sprzężonego, tak jak przedstawiono go na rys. 12-13. Model ten oparto na prostej modyfikacji mechanizmu zaproponowanego na rys. 12-6; bez względu na brak pewności co do szczegółów podstawę modelu stanowi główna zasada transportu sprzężonego: gdy braknie jednej z kotransportowanych substancji, transport drugiej substancji nie nastąpi.

W komórkach zwierząt szczególnie ważną rolę odgrywają te rodzaje symportu, które używają wpływanie Na^+ do komórki zgodnie z jego stromym gradientem elektrochemicznym do napędzania importu innych substancji do komórki. Na przykład komórki nabłonka wyścielającego jelito przenoszą glukozę ze światła jelita przez nabłonek jelita. Gdyby komórki te miały tylko bierne przenośniki glukozy opisane wcześniej, musiałyby uwalniać glukozę do jelita po posiłku bezcukrowym równie swobodnie, jak pobierają glukozę z jelita po posiłku bogatym w cukier. Na szczęście mają one również system symportu glukozy z Na^+, dzięki któremu mogą pobierać glukozę aktywnie ze światła jelita nawet wtedy, gdy stężenie glukozy w komórce jest większe niż w jelicie. Gdyby jednak komórki nabłonka jelita dysponowały tylko tym symportem, nigdy nie mogłyby oddać glukozy innym komórkom ciała. Dlatego też komórki te mają dwa typy przenośników glukozy. Szczytowa domena błony komórkowej kontaktująca ze światłem jelita zawiera sprzężone przenośniki symportowe glukozy i Na^+, które pobierają glukozę aktywnie, budując jej duże stężenie w cytozolu. W domenach bocznych i domenie przypodstawnej błona komórkowa tych komórek zawiera uniportowe przenośniki glukozy, które wyprowadzają ten metabolit do innych tkanek, zgodnie z gradientem stężenia (rys. 12-14). Oba typy przenośników glukozy są utrzymywane oddzielnie od siebie w odpowiednich domenach błony komórkowej dzięki barierze dyfuzyjnej utworzonej wokół szczytu komórki przez złącza ścisłe, które zapobiegają mieszaniu się składników błonowych między domenami błony komórkowej, o czym mówiono w rozdz. 11 (patrz rys. 11-37). Komórki wyścielające jelito i wiele innych organów, np. nerki, zawierają w swoich błonach komórkowych rozmaitość rodzajów symportu, podobnie napędzanych elektrochemicznym gradientem Na^+; każdy taki przenośnik specyficznie importuje do komórki małą grupę pokrewnych cukrów lub aminokwasów. Równie ważne są systemy antyportu napędzane przez Na^+. Przykładem jest *wymiennik* Na^+-H^+ w błonie komórkowej wielu komórek zwierzęcych. Antyport ten używa



Rys. 12-14. Dwa typy przenośnika glukozy umożliwiające komórkom nabłonka jelitowego przenoszenie glukozy poprzez wyściółkę jelita. Glukoza jest wprowadzona do komórki aktywnie przy powierzchni szczytowej przez przenośnik symportowy napędzany gradientem Na^+, a opuszcza komórkę biernie przy powierzchni podstawnej i bocznej poprzez przenośnik uniportowy, zgodnie z gradientem stężeń. Segregacji tych dwóch przenośników glukozy w błonie komórkowej strzegą połączenia zamykające

zgodnego z gradientem wpływu Na^+ do komórki do wypompowania z niej jonów H^+ i jest jednym z głównym urządzeń używanych przez komórki zwierzęce do kontrolowania poziomu pH w ich cytozolu.

Pytanie 12-3. Białko transbłonowe ma następujące właściwości: ma dwa miejsca wiążące, jedno dla substancji A, a drugie dla substancji B. Białko może ulec zmianom konformacyjnym przestawiającym go w dwa stany: albo oba miejsca wiążące będą eksponowane wyłącznie po jednej stronie błony, albo oba miejsca wiążące będą eksponowane wyłącznie po drugiej stronie błony. Białko może przełączać się z jednego stanu konformacyjnego w drugi tylko wtedy, gdy oba miejsca wiążące są zajęte lub gdy oba są puste, ale nie może tego przełączenia dokonać, gdy zajęte jest tylko jedno miejsce wiążące.

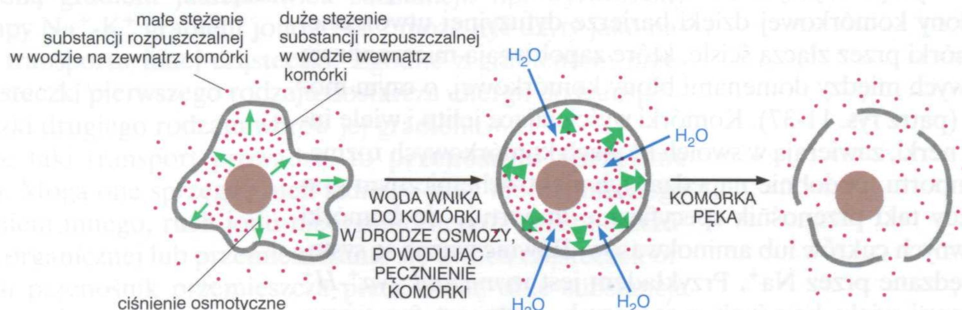
A. Jaki rodzaj białka te właściwości definiują?

B. Czy musisz sprecyzować jakiekolwiek dodatkowe właściwości, aby zmienić to białko w urządzenie symportowe, które sprzęga przemieszczanie substancji A wbrew jej gradientowi stężeń z przemieszczaniem substancji B zgodnie z jej gradientem elektrochemicznym?

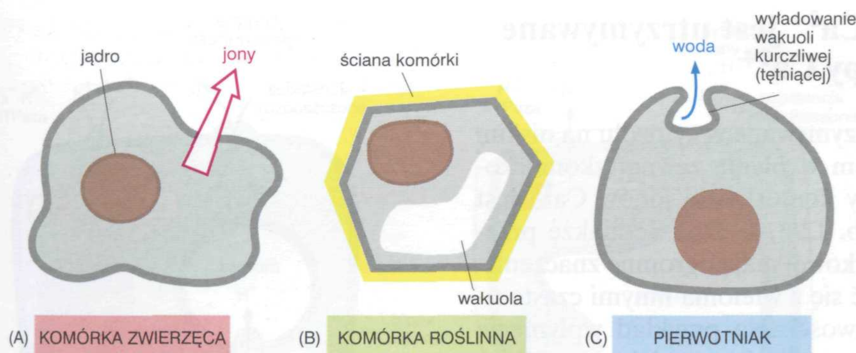
C. Spisz zasady definiujące antyport.

Pompa Na^+-K^+ pomaga w utrzymaniu osmotycznej równowagi komórek zwierzęcych

Błona komórkowa jest przepuszczalna dla wody (patrz rys. 11-20) i jeśli całkowite stężenie roztworów jest małe po jednej stronie, a duże po drugiej, woda będzie dążyć do przemieszczania się przez błonę, tak aby wyrównać stężenia roztworów. Taki ruch wody z przedziału o małym stężeniu roztworu (duże stężenie wody) do przedziału o dużym stężeniu roztworu (małe stężenie wody) nosi nazwę **osmozy**. Siła uruchamiająca ruch wody jest równa różnicy ciśnienia wody i jest określana jako **ciśnienie osmotyczne**. Przy braku jakiegokolwiek ciśnienia przeciwdziałającego, osmotyczny ruch wody do komórki spowoduje jej pęcznienie. Stwarza to poważne problemy dla komórek zwierzęcych, które nie mają sztywnej, zewnętrznej ściany, zapobiegającej pęcznieniu komórek. Komórki takie, umieszczone w czystej wodzie, będą w zasadzie pęczniały aż do pęknięcia (rys. 12-15).



Rys. 12-15. Osmoza. Gdy stężenie substancji rozpuszczonych wewnątrz komórki jest większe niż na zewnątrz, woda będzie wnikać w drodze osmozy do komórki, powodując jej pęcznienie. Przy dostatecznie dużej różnicy stężeń komórka pęknie



Rys. 12-16. Trzy drogi, jakimi komórka unika pęcznienia osmotycznego. Komórka zwierzęca utrzymuje małe wewnątrzkomórkowe stężenie substancji rozpuszczalnych w wodzie przez wypompowanie jonów (A). Komórka roślinna jest chroniona przed pęcznieniem i pękaniem przez sztywną ścianę komórkową (B). Pierwotniaki unikają pęcznienia przez okresowe wyrzucanie wody, która wnika do komórki (C)

W tkankach ciała zwierząt komórki są zanurzone w płynie bogatym w substancje rozpuszczone, zwłaszcza Na^+ i Cl^-. To równoważy stężenie substancji organicznych i nieorganicznych zawartych w komórce i przeciwdziała katastrofie osmotycznej. Jednak równowaga osmotyczna pozostaje w stałym niebezpieczeństwie zachwiania, ponieważ pozakomórkowe substancje rozpuszczone ustawicznie wciekają do komórki, zgodnie z ich indywidualnymi gradientami elektrochemicznymi. Aby utrzymać równowagę osmotyczną, komórka musi więc wykonywać stałą pracę, wypompowując niepożądane substancje rozpuszczalne (rys. 12-16A). Funkcję tę pełni głównie pompa Na^+-K^+, która wypompowuje wpływające jony Na^+. W tym samym czasie pompa Na^+-K^+, pomagając w utrzymaniu potencjału błonowego (co wyjaśnimy później), dąży do zapobieżenia wpływaniu jonów Cl^-, które są naładowane ujemnie. Jeśli pompę zahamuje się inhibitorem, np. strofantyną, lub gdy po prostu komórce zabraknie ATP jako paliwa dla pompy, jony Na^+ i Cl^- wnikną przez przenośniki i otwarte kanały jonowe, niszcząc równowagę osmotyczną, przez co komórki spęcznieją i w końcu popękają.

Inne komórki regulują swoje problemy osmotyczne odmiennymi sposobami. Komórki roślinne są chronione przed pęcznieniem i pękaniem przez ich sztywne ściany komórkowe i dlatego mogą tolerować duże różnice osmotyczne po obu stronach ich błony komórkowej (rys. 12-16B). Ściana komórkowa wywiera przeciwdziałający nacisk, który zdolny jest zrównoważyć ciśnienie osmotyczne wytworzone przez roztwory w komórce i przez to ogranicza wpływanie wody do komórki. Osmoza łącznie z aktywnym transportem jonów do komórki powoduje *ciśnienie turgorowe*, które utrzymuje komórki roślinne w stanie rozciągniętym przez wodę, a ich ściany komórkowe napięte. Tak więc komórki roślinne są jak piłka nożna, której skórzana powłoka jest utrzymywana w napięciu przez ciśnienie napompowanej wewnętrznej dętki; ściana komórki działa jak zewnętrzna powłoka piłki, a błona komórkowa jak gumowa dętka. Ciśnienie turgorowe służy wielu funkcjom. Utrzymuje sztywność łodygi roślin i rozwiniętą postać liści. Odgrywa rolę w regulowaniu wymiany gazowej przez szparki — mikroskopowe „usta" na powierzchni liścia; komórki szparkowe wokół szparek regulują swoje ciśnienie turgorowe (poprzez kontrolowanie ruchów K^+ w poprzek błony komórkowej) w celu otwierania i zamykania szparek.

U pewnych pierwotniaków żyjących w wodzie słodkiej, np. ameb, nadmiar wody, która ustawicznie wpływa do komórki, jest gromadzony w wakuolach kurczliwych, okresowo wyładowujących swą zawartość na zewnątrz (rys. 12–16C). Komórka początkowo dopuszcza do wypełnienia wakuol roztworem bogatym w związki rozpuszczalne, co pociąga za sobą wpływanie wody w drodze osmozy. Następnie komórka odzyskuje substancje rozpuszczone przez aktywne przepompowanie ich do cytozolu, zanim wakuola zostanie opróżniona na zewnątrz. Jednak w większości komórek zwierzęcych w zachowaniu równowagi osmotycznej kluczową rolę odgrywa pompa Na^+-K^+.

Wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} jest utrzymywane na niskim poziomie przez pompy Ca^{2+}

Stężenie Ca^{2+}, podobnie jak Na^+, jest utrzymywane w cytozolu na niskim poziomie w porównaniu z jego stężeniem w płynie zewnątrzkomórkowym, ale ogólnie po obu stronach błony komórkowej jonów Ca^{2+} jest znacznie mniej niż jonów Na^+ (patrz tab. 12-1, s. 373). Jednakże przemieszczenia Ca^{2+} w poprzek błony komórkowej mają ogromne znaczenie, ponieważ Ca^{2+} może bardzo ściśle wiązać się z wieloma innymi cząsteczkami w komórce, zmieniając ich właściwości. Na przykład wpłynięcie Ca^{2+} do cytozolu przez kanały Ca^{2+} jest często używane jako sygnał inicjujący wiele procesów komórkowych, takich jak sekrecja cząsteczek sygnałowych i skurcz komórek mięśniowych.

Im mniejsze jest stanowiące tło stężenie wolnego Ca^{2+} w cytozolu, tym większa jest wrażliwość komórki na wzrost tego stężenia. Tak więc komórki eukariotyczne utrzymują w zasadzie bardzo małe stężenie wolnego Ca^{2+} w cytozolu (ok. 10^{-7} M), natomiast zewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} jest niezwykle duże (typowo 1–2 mM). Różnica ta jest utrzymana głównie dzięki działaniu napędzanych przez ATP pomp Ca^{2+} występujących zarówno w błonie komórkowej, jak i w błonie retikulum endoplazmatycznego, które to pompy aktywnie usuwają Ca^{2+} z cytozolu.

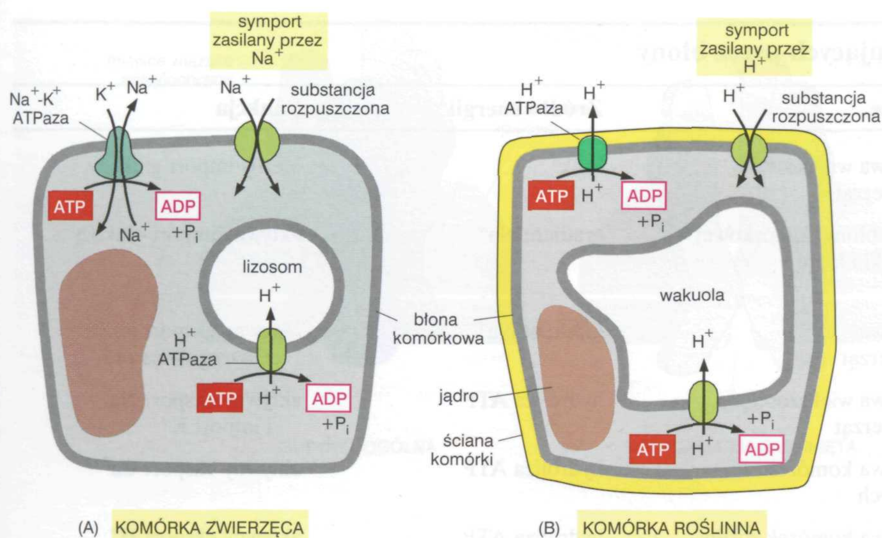
Podobnie jak pompa Na^+-K^+, pompa Ca^{2+} jest ATPazą transportującą, która w czasie cyklu swego działania ulega fosforylowaniu i defosforylacji. Pracuje najprawdopodobniej w taki sam sposób, jaki przedstawiono dla pompy Na^+-K^+ na rys. 12-11, z tym tylko, że powraca do swej wyjściowej konformacji bez wiązania i transportowania drugiego jonu. Te dwie pompy napędzane przez ATP mają podobne sekwencje aminokwasów i podobną budowę, którą charakteryzuje obecność w każdej podjednostce ok. 10 α helis transbłonowych; mają one najwyraźniej wspólne pochodzenie ewolucyjne.

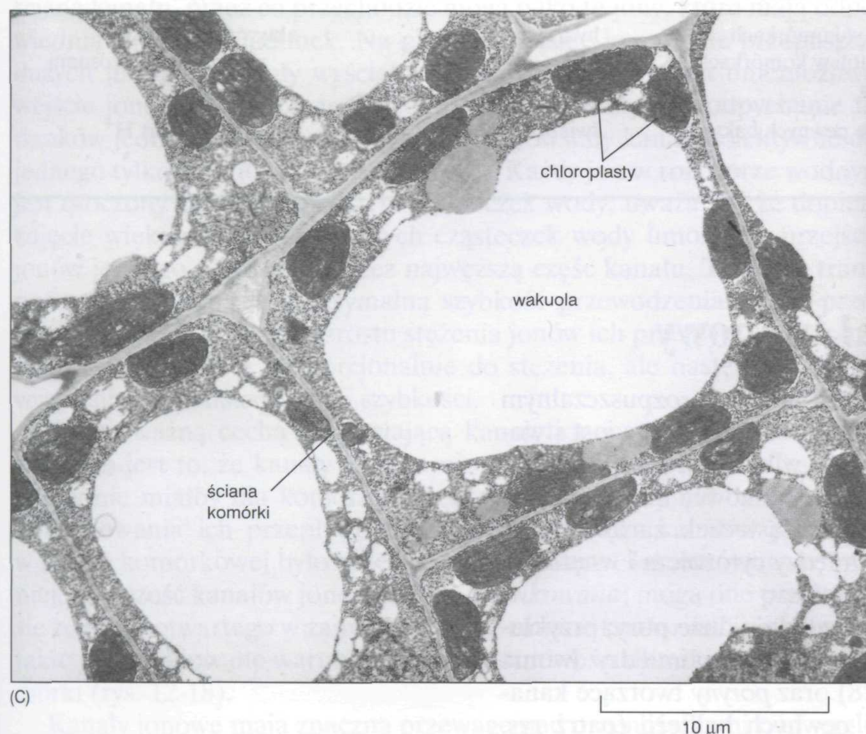
Pytanie 12-4. Zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} powoduje skurcz komórek mięśniowych. Obok pompy Ca^{2+} zasilanej przez ATP szybko i regularnie kurczące się komórki mięśniowe, takie jak w sercu, mają przenośnik antyportowy wymieniający poprzez błonę komórkową Ca^{2+} na zewnątrzkomórkowy Na^+. Większość jonów Ca^{2+}, które wniknęły do komórki podczas skurczu, jest szybko wypompowywana przez ten antyportowy przenośnik z powrotem poza komórkę, co umożliwia relaksację komórki. Strofantyna i digitalis są ważnymi środkami farmakologicznymi w leczeniu pacjentów cierpiących na osłabienie mięśnia sercowego, ponieważ umożliwiają silniejsze skurcze serca. Oba leki działają na zasadzie częściowego hamowania pompy Na^+-K^+ w błonie komórki mięśnia sercowego. Czy możesz zaproponować wyjaśnienie tego działania leków u pacjentów? Co się stanie, jeśli poda się za dużo któregokolwiek z tych leków?

Do zasilania transportu błonowego rośliny, grzyby i bakterie używają gradientów H^+

Komórki roślin, grzybów (w tym drożdży) i bakterii nie mają w swych błonach komórkowych pompy Na^+-K^+. W miejsce elektrochemicznego gradientu Na^+, do zasilania transportu substancji rozpuszczonych do komórki używają one głównie elektrochemicznego gradientu H^+. Gradient ten jest tworzony przez pompy H^+ w błonie komórkowej, które wypompowują H^+ z komórki wytwarzając elektrochemiczny gradient protonowy o stężeniu H^+ większym na zewnątrz niż w środku komórki; w procesie tym pompa H^+ zakwasza również środowisko otaczające komórkę. Na przykład pobieranie wielu cukrów i aminokwasów do komórek bakteryjnych jest napędzane symportem H^+, który używa elektrochemicznego gradientu H^+ istniejącego w poprzek błony komórkowej w sposób w zasadzie identyczny z tym, w jaki komórki zwierzęce używają elektrochemicznego gradientu Na^+.

W pewnych bakteriach fotosyntetyzujących gradient H^+ jest budowany działaniem pomp H^+ zasilanych światłem, takich jak bakteriorodopsyna. U innych bakterii gradient jest wytwarzany działaniem białek błony komórkowej prowadzących końcowe etapy oddychania komórkowego związanego z syntezą ATP, o czym będzie mowa w rozdz. 13. Jednakże rośliny, grzyby i jeszcze inne bakterie budują swój gradient H^+ działaniem zawartych w ich błonach komórkowych ATPaz, które używają energii hy-





Rys. 12-17. Pewne podobieństwa i różnice między komórkami zwierząt i roślin w zakresie transportu rozpuszczalnych w wodzie substancji przez błonowe białka transportujące. O ile w komórkach zwierząt aktywny transport rozpuszczalnych substancji poprzez błonę komórkową jest często zasilany elektrochemicznym gradientem Na^+, tworzonym przez pompę Na^+-K^+ (Na^+-K^+ ATPazę) (A), o tyle w komórkach zarówno roślin (B), jak i bakterii oraz grzybów (w tym drożdży) zasilanie takie stanowi elektrochemiczny gradient H^+, zazwyczaj tworzony przez H^+ ATPazę typu P. Lizosomy w komórkach zwierząt oraz wakuole w komórkach roślin i grzybów mają w swych błonach H^+ ATPazę typu V, która pompuje H^+ do środka tych organelli, umożliwiając utrzymanie w nich kwaśnego środowiska. Mikrografia elektronowa ukazuje wakuolę komórki młodego liścia tytoniu (C). (C dzięki uprzejmości: J. Burgess)

drolizy ATP do wypompowywania H^+ z komórki; przypominają one pompy Na^+-K^+ i pompy Ca^{2+} w komórkach ssaków, o których mówiono uprzednio.

Odmienny typ H^+ ATPazy występuje w błonach pewnych organelli komórkowych, takich jak lizosomy komórek zwierząt oraz centralna wakuola komórek roślin i grzybów. Ich funkcją jest pompowanie H^+ z cytozolu do organelli, co umożliwia utrzymanie neutralnego pH w cytozolu, a zakwaszenie wnętrza organelli. Kwaśne środowisko wnętrza wielu organelli jest istotne dla ich funkcji, o czym będzie mowa w rozdz. 14.

Pewne, dopiero co omówione białka czynne przy transporcie błonowym w komórkach zwierząt i roślin pokazano na rys. 12-17. Zarówno te, jak i niektóre inne białka transportujące omawiane w tym rozdziale zestawiono w tab. 12-2 (s. 386).

Obecnie przejdziemy do transportu przez kanały jonowe i do budowania potencjału błonowego.

Tabela 12-2. **Przykłady białek transportujących przez błony**

Białko transportujące	Umiejscowienie	Źródło energii	Funkcja
Przenośnik glukozy	błona komórkowa większości komórek zwierząt	brak	bierny import glukozy
Symportowy przenośnik Na^+ — glukoza	szczytowa część błony komórkowej komórek nerki i jelita	gradient Na^+	aktywny import glukozy
Wymiennik Na^+-H^+	błona komórkowa komórek zwierząt	gradient Na^+	aktywny eksport jonów H^+, regulacja pH
Pompa Na^+- K^+ (Na^+-K^+ ATPaza)	błona komórkowa większości komórek zwierząt	hydroliza ATP	aktywny eksport Na^+ i import K^+
Pompa Ca^{2+} (Ca^{2+} ATPaza)	błona komórkowa komórek eukariotycznych	hydroliza ATP	aktywny eksport Ca^{2+}
Pompa H^+ (H^+ ATPaza typu P)	błona komórkowa komórek roślin, grzybów i pewnych bakterii	hydroliza ATP	aktywny eksport H^+ z komórki
Pompa H^+ (H^+ ATPaza typu V)	błony lizosomów w komórkach zwierząt i wakuoli w komórkach roślin i grzybów	hydroliza ATP	aktywny eksport H^+ z cytozolu do lizosomu i wakuoli
Bakteriorodopsyna	błona komórkowa pewnych bakterii	światło	aktywny eksport H^+ z komórki

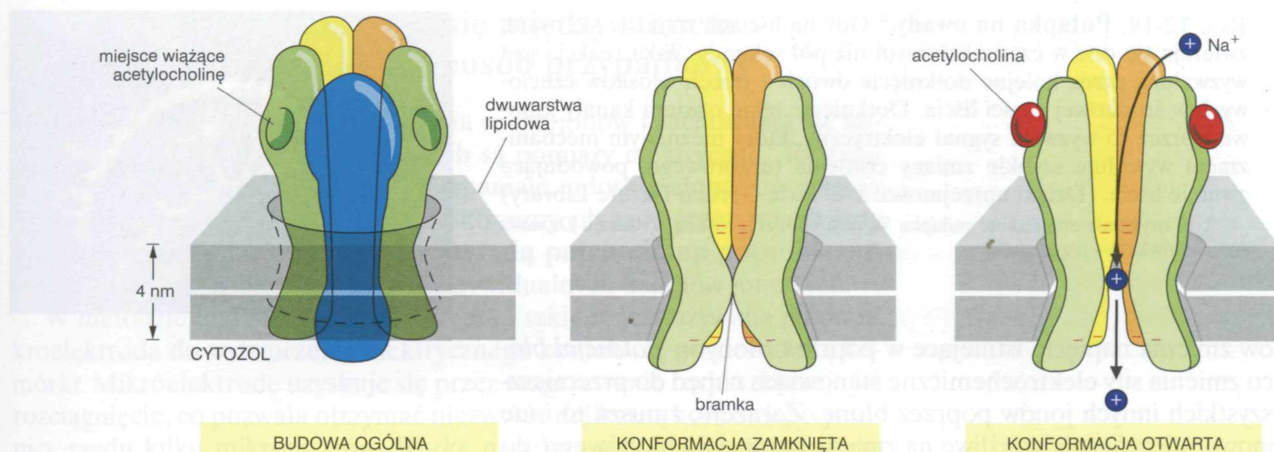
Kanały jonowe i potencjał błonowy

W zasadzie najprostszą drogą umożliwiającą małym, rozpuszczalnym w wodzie cząsteczkom przejście z jednej strony błony na drugą jest stworzenie hydrofilowego kanału. Funkcję tę pełnią w błonach komórkowych **białka kanałowe**, tworzące wodne pory transbłonowe, umożliwiające bierny ruch małych, rozpuszczalnych w wodzie cząsteczek, zarówno między cytozolem i otoczeniem komórki, jak i między cytozolem i wnętrzem organelli.

Tylko nieliczne białka kanałowe tworzą względnie duże pory; przykładem są białka, które tworzą *połączenia komunikacyjne* pomiędzy dwoma przylegającymi komórkami (patrz rys. 19-28) oraz *poryny* tworzące kanały w zewnętrznej błonie mitochondriów i pewnych bakterii (patrz rys. 11-26). Jednak takie duże, działające bez ograniczeń kanały powodowałyby katastrofalne przecieki, gdyby bezpośrednio łączyły cytozol komórki z przestrzenią zewnątrzkomórkową. Dlatego też większość białek kanałowych w błonie komórkowej komórek zwierząt i roślin jest całkowicie odmienna i ma pory wąskie, o dużej selektywności. Prawie wszystkie te białka są **kanałami jonowymi**, prowadzącymi wyłącznie transport jonów nieorganicznych, głównie Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{2+}.

Kanały jonowe są jonowo selektywne i bramkowane

Dwie ważne właściwości odróżniają kanały jonowe od prostych porów wodnych. Po pierwsze wykazują one *selektywność jonową* pozwalającą na przejście tylko niektórych jonów nieorganicznych. Selektywność jonowa zależy od średnicy i kształtu kanału jonowego oraz od rozmieszczenia w wyściółce kanału naładowanych reszt aminokwasowych. Kanał jest



Rys. 12-18. Budowa kanału jonowego. Pokazany na rysunku kanał jonowy jest obecny w błonie komórkowej komórek mięśniowych i otwiera się po związaniu przekaźnika nerwowego — acetylocholiny — uwolnionej przez zakończenia nerwowe. Jest on przykładem kanału bramkowanego przez przekaźnik nerwowy, o czym będzie mowa później. (Według innej klasyfikacji kanałów jest to zarazem receptor jonotropowy lub receptor acetylocholinowy typu N — *przyp. tłum.*). Kanał jest złożony z pięciu transbłonowych podjednostek białkowych, które łącznie tworzą wodny por przechodzący poprzez dwuwarstwę lipidową. Por jest wyścielony pięcioma transbłonowymi α helisami, po jednej z każdej podjednostki. Ujemnie naładowane reszty aminokwasowe tworzące pierścienie po obu stronach poru sprawiają, że mogą przejść tylko jony naładowane dodatnio, głównie Na^+ i K^+. Gdy kanał jest w swej konformacji zamkniętej, por jest zablokowany hydrofobowymi resztami aminokwasowymi w miejscu zwanym *bramką*; po związaniu acetylocholiny białko ulega zmianie konformacyjnej powodującej rozejście się tych reszt i otwarcie bramki, co umożliwia przepływ Na^+ i K^+ poprzez błony, zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym. Jak omówimy to później, nawet wtedy gdy acetylocholina jest związana z kanałem, kanał oscyluje w sposób przypadkowy między stanem otwartym i zamkniętym; jednakże bez związanej acetylocholiny kanał otwiera się rzadko

w pewnych miejscach dostatecznie wąski, aby zmusić jony do kontaktu ze ścianą kanału, przez co przechodzić mogą tylko te jony, które mają odpowiednią wielkość i ładunek. Na przykład wąskie kanały nie przepuszczą dużych jonów, a kanały wyścielone ładunkami ujemnymi uniemożliwią wejście jonów ujemnych ze względu na elektrostatyczne odpychanie ładunków jednoimiennych. Na tej zasadzie powstały kanały selektywne dla jednego tylko typu jonu, np. Na^+ lub Cl^-. Każdy jon w roztworze wodnym jest otoczony cienkim płaszczem cząsteczek wody; uważa się, że dopiero zdjęcie większości towarzyszących cząsteczek wody umożliwia przejście jonów jednego po drugim przez najwęższą część kanału. Ten etap transportu jonu ogranicza maksymalną szybkość przewodzenia jonów przez kanał. Tak więc w miarę wzrostu stężenia jonów ich przepływ przez kanał początkowo wzrasta proporcjonalnie do stężenia, ale następnie ulegnie wysyceniu przy maksymalnej szybkości.

Drugą ważną cechą odróżniającą kanały jonowe od prostych porów wodnych jest to, że kanały jonowe nie są ustawiczne otwarte. Transport jonów nie miałby dla komórki żadnej wartości, gdyby nie było sposobu kontrolowania ich przepływu i gdyby wiele tysięcy kanałów jonowych w błonie komórkowej było przez cały czas otwarte. Jak omówimy to później, większość kanałów jonowych jest *bramkowana*; mogą one przełączać się ze stanu otwartego w zamknięty przez zmianę konformacji, a przejście takie jest regulowane warunkami panującymi w środku i na zewnątrz komórki (rys. 12-18).

Kanały jonowe mają znaczną przewagę nad przenośnikami pod względem ich maksymalnej szybkości transportu. Przez jeden kanał może w ciągu każdej sekundy przejść ponad milion jonów, co jest szybkością 1000 razy większą niż największa znana szybkość transportu dokonywanego przez jakikolwiek przenośnik. Z drugiej strony, kanały nie mogą sprzęgnąć przepływu jonów z żadnym źródłem energii, co umożliwiłoby im prowadzenie transportu aktywnego. Tak więc funkcją większości kanałów jonowych jest uczynienie błony przejściowo przepuszczalną dla wybranych jonów nieorganicznych, głównie Na^+, K^+, Ca^{2+} i Cl^-, pozwalając — w czasie otwarcia bramek kanałów — na szybkie dyfuzyjne przejście tych jonów poprzez błonę zgodnie z ich gradientami elektrochemicznymi.

W wyniku aktywnego transportu prowadzonego przez pompy i inne białka transportujące, większość stężeń jonowych po obu stronach błony jest daleko odsunięta od równowagi. Dlatego też po otwarciu kanału jony szybko przez niego przepływają. Takie szybkie wpływanie jonów wytwarza puls ładunku elektrycznego albo doprowadzonego do komórki (gdy jony wpływają), albo wyprowadzonego z komórki (gdy jony wypływają). Prze-

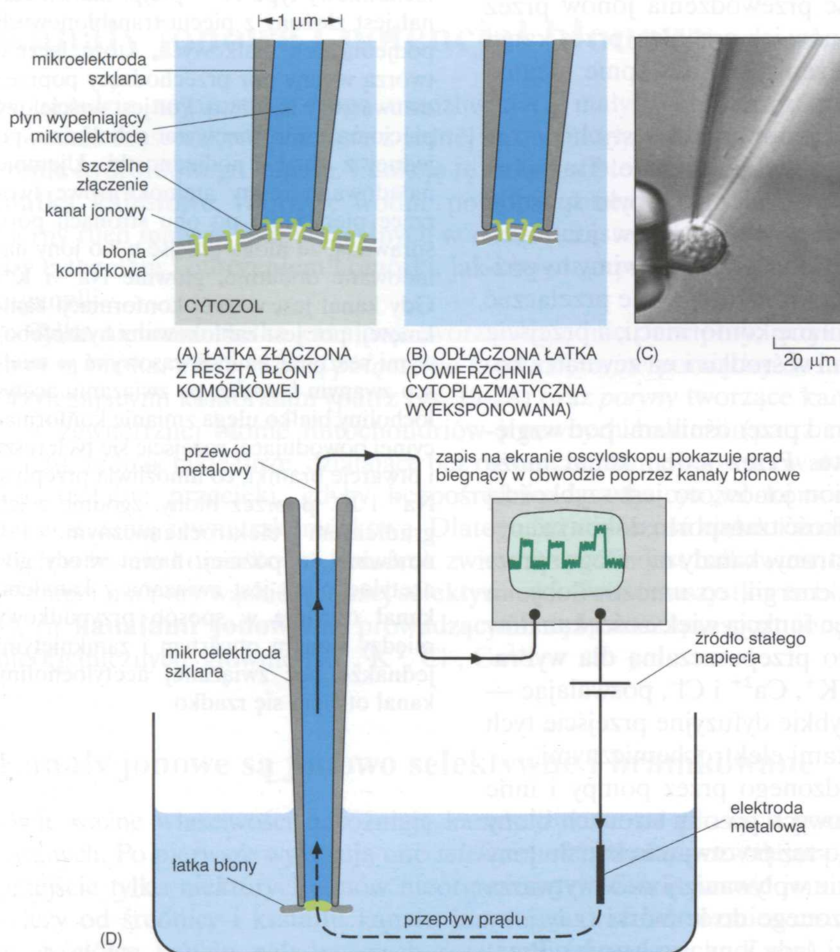


Rys. 12-19. Pułapka na owady.* Gdy na liściach znajdzie się owad, zwierają się one w czasie krótszym niż pół sekundy. Taka reakcja jest wyzwalana przez kolejne dotknięcie dwóch z trzech włosków czuciowych w środkowej części liścia. Dotknięcie takie otwiera kanały jonowe i przez to wyzwala sygnał elektryczny, który nieznanym mechanizmem wywołuje szybkie zmiany ciśnienia turgorowego, powodujące zwarcie liścia. (Dzięki uprzejmości: J. S. Sira, Garden Picture Library)

* W oryginale angielskim: pułapka Wenus; chodzi o roślinę z rodzaju *Dionaea* (muchołówka) — *przyp. tłum.*

pływ jonów zmienia napięcie istniejące w poprzek błony — *potencjał błonowy* — co zmienia siły elektrochemiczne stanowiące napęd do przemieszczania wszystkich innych jonów poprzez błonę. Zarazem, zmusza to inne kanały jonowe, specyficznie wrażliwe na zmiany potencjału błonowego, do otwarcia się lub zamknięcia w ciągu milisekund. Wynikająca stąd eksplozja aktywności elektrycznej może szybko przemieszczać się z jednego obszaru błony komórkowej do drugiego, przewodząc sygnały elektryczne, co omówimy później w związku z komórkami nerwowymi. Ten typ sygnalizacji elektrycznej nie jest ograniczony do zwierząt, ale występuje też u pierwotniaków i roślin; np. mięsożerna roślina, rosiczka, używa sygnalizacji elektrycznej do wyczuwania obecności i złapania owadów (rys. 12-19).

Potencjał błonowy stanowi podstawę każdej aktywności elektrycznej w komórce, zarówno roślin, zwierząt, jak i pierwotniaków. Zanim jednak omówimy, jak powstaje potencjał błonowy, zobaczymy, jak można mierzyć aktywność kanału jonowego.



Rys. 12-20. Technika zapisu metodą patch-clamp. Z powodu obecności niezwykle szczelnego złączenia ujścia mikroelektrody z błoną, prąd może przepływać przez mikroelektrody tylko przechodząc przez kanały w łatce zakrywającej ujście elektrody. Nazwę „clamp" (zwarcie) stosuje się ze względu na zastosowane urządzenia elektroniczne służące do utrzymania potencjału błonowego przy ustalonej wartości w czasie zapisywania prądu jonowego przepływającego przez poszczególne kanały. Zapisy takich prądów można uzyskać w sytuacji, gdy łatka jest ciągle złączona z resztą błony komórkowej — jak w (A) lub od niej odłączona — jak w (B). Korzyść pracy z oderwaną łatką polega na tym, że łatwo można zmieniać skład roztworów po każdej stronie błony i w ten sposób sprawdzać wpływ różnych rozpuszczonych substancji na zachowanie się kanałów. Mikrografia (C) ukazuje komórkę nerwową oka utrzymaną, przez zassanie, na pipetce (której zakończenie pokazano po stronie *lewej*), natomiast mikroelektroda (*na górze* po stronie *prawej*) jest użyta do zapisu metodą patch-clamp. (D) Obwód zastosowany w zapisie patch-clamp. (C z: T. D. Lamb, H. R. Matthews, V. Torre, *J. Physiol.* 372: 315–349, 1986)

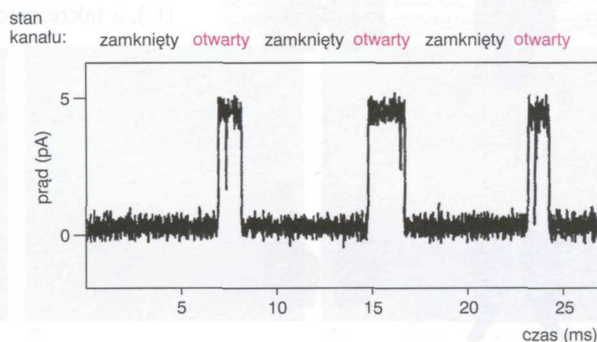
Kanały jonowe przełączają się między stanem otwartym i zamkniętym w sposób przypadkowy

Główną metodą stosowaną do badania ruchu jonów i zachowania się kanałów jonowych w żywych komórkach są pomiary elektryczne. Techniki zapisu elektrycznego zostały tak wspaniale udoskonalone, że można obecnie wykrywać i mierzyć prąd elektryczny płynący przez pojedynczy kanał. Procedura znana jako **zapis metodą patch-clamp** pozwoliła odtworzyć zdumiewający obraz pracy indywidualnych kanałów jonowych.

W metodzie tej bardzo cienka rureczka szklana jest używana jako mikroelektroda do wytworzenia elektrycznego kontaktu z powierzchnią komórki. Mikroelektrodę uzyskuje się przez rozgrzewanie rurki szklanej i jej rozciągnięcie, co pozwala otrzymać niezwykle delikatną końcówkę o średnicy rzędu kilku mikrometrów. Rurkę napełnia się wodnym roztworem przewodzącym prąd, a końcówką naciska się powierzchnię komórki. Przez delikatne zassanie wytwarza się szczelne złącze elektryczne pomiędzy błoną komórkową a ujściem mikroelektrody (rys. 12-20A). Jeśli chcemy odsłonić cytozolową stronę błony, łatkę błony przychwyconą mikroelektrodą delikatnie oddzielamy od komórki (rys. 12-20B). W drugi, otwarty koniec mikroelektrody wprowadza się cienki metalowy przewód. Prąd wchodzący do mikroelektrody przez kanały jonowe w małej łatce błony zakrywającej końcówkę elektrody przechodzi poprzez przewód do aparatów pomiarowych, a stąd do łaźni z płynem, w której jest umieszczona komórka lub oderwana z niej łatka (rys. 12-20D). Pomiary metodą patch-clamp umożliwiają uzyskanie zapisu działania kanałów jonowych we wszystkich typach komórek — nie tylko w dużych komórkach nerwowych, znanych ze swej aktywności elektrycznej, ale również w komórkach takich jak drożdże, zbyt małych, aby zachodzące w nich zjawiska elektryczne wykryć jakąkolwiek inną metodą.

Zmieniając stężenie jonów środowiska po którejkolwiek stronie łatki błony można sprawdzić, jaki jon będzie przechodził przez kanał. Przy odpowiednim obwodzie elektronicznym można ustalić napięcie istniejące w poprzek łatki błony, czyli potencjał błonowy, i utrzymywać go na stałym, dowolnie wybranym poziomie. W ten sposób można sprawdzić, jak zmiany potencjału błonowego wpływają na otwieranie się i zamykanie kanałów w błonach.

Gdy obszar błony zamkniętej końcówką elektrody jest dostatecznie mały, można natrafić na sytuację, w której będzie obecny tylko pojedynczy kanał jonowy. Nowoczesna aparatura elektryczna jest dostatecznie czuła, aby wykryć przepływ jonów poprzez pojedynczy kanał wyrażony niezwykle małym prądem (rzędu 10^{-12} A). Zachowanie się takich prądów jest zazwyczaj zaskakujące; nawet przy utrzymaniu stałych warunków prądy nagle pojawiają się i znikają, tak jakby ktoś przypadkowo bawił się wyłącznikiem (rys. 12-21). Takie zachowanie sugeruje, że kanał ma ruchome



Rys. 12-21. Prąd przepływający przez pojedynczy kanał jonowy, zapisany techniką patch-clamp. Napięcie w poprzek izolowanej łatki błony (potencjał błonowy) utrzymywano podczas zapisu na stałym poziomie. W tym przykładzie błona pochodzi z komórki mięśniowej i zawiera pojedyncze białko kanałowe typu przedstawionego na rys. 12-18, które reaguje na przekaźnik nerwowy — acetylocholinę. Gdy acetylocholina zwiąże się zewnętrzną powierzchnią kanału, ten kanał jonowy otwiera się umożliwiając przepływ dodatnich jonów, co występuje w tym przypadku. Jednakże nawet gdy acetylocholina jest związana z kanałem, nie pozostaje on przez cały czas otwarty, ale oscyluje między stanem otwartym i zamkniętym. W zarejestrowanym tu czasie [ok. 25 milisekund (ms)] kanał otworzył się trzykrotnie na różne okresy. Gdyby acetylocholina nie była związana z kanałem, otwierałby się on rzadko. (Dzięki uprzejmości: David Colquhoun)

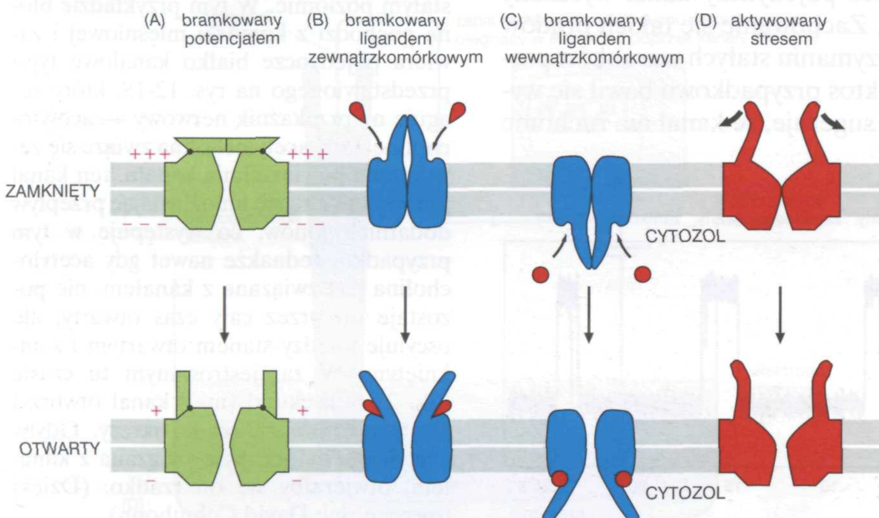
części i przełącza się tam i z powrotem od jednej do drugiej konformacji (patrz rys. 12-18). Ponieważ takie zachowanie pojawia się nawet przy doświadczalnym utrzymaniu stałości warunków, wskazuje, że prawdopodobnie białko kanału jest wybijane z jednej konformacji w drugą termicznymi ruchami cząsteczek w jego otoczeniu. Jest to jeden z nielicznych przypadków, w których można śledzić zmiany konformacyjne pojedynczej cząsteczki białka. Wyłaniający się obraz drgającej maszyny poddanej stałym poszturchiwaniom mógłby być z pewnością zastosowany do innych białek mających ruchome części.

Jeśli kanały w przypadkowy sposób przechodzą z konformacji otwartej do zamkniętej nawet wtedy, gdy warunki po każdej stronie błony są stałe, zastanawiające jest, w jaki sposób ich stan może być regulowany warunkami panującymi na zewnątrz komórki i w jej wnętrzu? Odpowiedź jest taka, że przy zmianie odpowiednich warunków przypadkowość zachowania zostaje zachowana, ale znacznie zmienia się prawdopodobieństwo. Jeśli na przykład zmienione warunki wykazują tendencję do otwierania kanału, to kanał będzie występował w konformacji otwartej znacznie częściej, aczkolwiek nie pozostanie otwarty w sposób ciągły (patrz rys. 12-21). Gdy kanał jonowy jest otwarty, to jest otwarty całkowicie, a kiedy jest zamknięty, to też całkowicie.

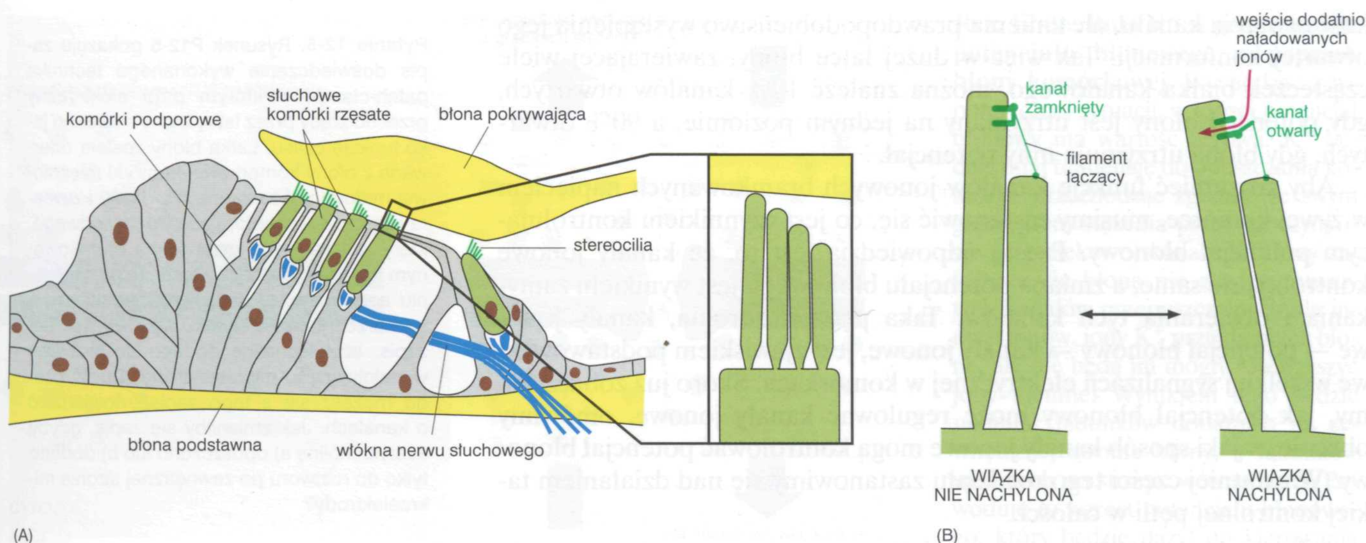
Kanały jonowe bramkowane napięciem reagują na potencjał błonowy

Odkryto dotąd ponad sto typów kanałów jonowych i ciągle znajduje się nowe. Różnią się one między sobą głównie pod względem 1) *selektywności jonów* — a więc typem jonów, których przepływ umożliwiają i 2) *bramkowania* — a więc warunków wpływających na ich otwieranie i zamykanie.

W przypadku **kanału bramkowanego napięciem** prawdopodobieństwo otwarcia jest kontrolowane przez potencjał błonowy (rys. 12-22A). W przypadku **kanału bramkowanego ligandem**, np. receptora acetylocholiny przedstawionego na rys. 12-18, stan otwarcia jest kontrolowany związaniem określonej cząsteczki (liganda) z białkiem kanału (rys. 12-22B, C). Otwarcie **kanału aktywowanego przez stres** jest kontrolowane siłą mechaniczną przyłożoną do kanału (rys. 12-22D). *Rzęsate komórki słuchowe* w uchu są ważnym przykładem komórek, których działanie zależy od tego typu kanału. Drgania akustyczne otwierają kanały aktywowane przez stres powodując wpłynięcie jonów do komórek rzęsatych;



Rys. 12-22. Bramkowane kanały jonowe. W zależności od typu kanału jonowego bramki otwierają się w odpowiedzi na: zmianę potencjału transbłonowego (A), związanie z kanałem chemicznego liganda z zewnątrz (B) lub z wnętrza komórki (C), a także mechaniczną stymulację (D)



Rys. 12-23. W jaki sposób kanały jonowe aktywowane stresem pozwalają nam słyszeć. (A) Przekrój narządu Cortiego przebiegającego wzdłuż ślimaka (cochlea) ucha wewnętrznego. Każda słuchowa komórka rzęsata ma pęczek rzęsek o nazwie stereocilia. Komórki rzęsate są zagłębione w warstwie komórek podporowych wciśniętej między tzw. *błonę (blaszkę) podstawną* (od spodu) i *błonę pokrywającą* (od góry). (Obie te błony nie są dwuwarstwami lipidowymi, ale warstwami substancji zewnątrzkomórkowej). (B) Drgania akustyczne wywołują wibracje błony podstawnej w górę i w dół, co powoduje pochylenie stereocilii. Każde stereocilium chwiejnego układu tych rzęsek na każdej komórce rzęsatej jest połączone przez cienki filament z najbliższym, krótszym stereocilium. Pochylenie naciąga filamenty, które rozwierają kanały jonowe aktywowane stresem w błonie stereocilium, umożliwiając wejście do komórki dodatnio naładowanych jonów z otaczającego płynu. Wpłynięcie jonów aktywuje komórki rzęsate, które stymulują leżące poniżej komórki nerwowe przekazujące sygnały akustyczne do mózgu. Mechanizm działania komórki rzęsatej jest zdumiewająco czuły: siłę wymaganą do otwarcia pojedynczego kanału określa się jako ok. $2 \cdot 10^{-13}$ niutonów, a najsłabszy dźwięk, który możemy słyszeć, naciąga prawdopodobnie filamenty średnio o 0,04 nm, tj. mniej niż wynosi średnica jonu wodoru

powoduje to powstanie sygnału elektrycznego, który jest przenoszony z komórek włosowych do nerwu słuchowego przewodzącego sygnał do mózgu (rys. 12-23).

Kanały bramkowane napięciem odgrywają główną rolę w przewodzeniu sygnałów elektrycznych przez komórki nerwowe. Są one również obecne w wielu innych komórkach, takich jak komórki mięśniowe i jajowe, pierwotniaki, a nawet komórki roślin, gdzie umożliwiają przenoszenie sygnałów elektrycznych z jednej części rośliny do drugiej, na przykład podczas reakcji zamykania liści u mimozy (rys. 12-24). Kanały jonowe bramkowane napięciem mają wyspecjalizowane naładowane elektrycznie domeny białkowe nazywane *czujnikami napięcia*, które są niezwykle wrażliwe na zmiany potencjału błonowego: zmiany przekraczające określoną wartość progową wywierają na te domeny dostateczną siłę elektryczną, aby spowodować przełączenie się kanału z konformacji zamkniętej w otwartą lub odwrotnie. Zmiana napięcia nie ma wpływu na szero-

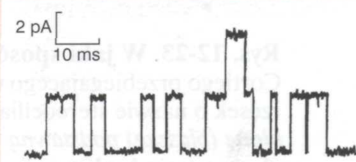


Rys. 12-24. Reakcja zamykania liści u mimozy. (A) Liść w stanie spoczynku. (B i C) Stopniowana odpowiedź na dotknięcie; w parę sekund po dotknięciu liścia listki zapadają się. W reakcji bierze udział otwieranie się kanałów jonowych zależnych od potencjału, co wytwarza impuls elektryczny. Gdy impuls ten osiąga wyspecjalizowane komórki zawiasowe u podstawy każdego listka, zachodzi w nich gwałtowna utrata wody, powodująca nagłe zapadanie się listków postępujące w dół łodyżki liścia. (Dzięki uprzejmości: G. I. Bernard. © Oxford Scientific Films)

kość otwarcia kanału, ale zmienia prawdopodobieństwo wystąpienia jego otwartej konformacji. Tak więc w dużej łatce błony, zawierającej wiele cząsteczek białka kanałowego, można znaleźć 10% kanałów otwartych, gdy potencjał błony jest utrzymany na jednym poziomie, a 90% otwartych, gdy błona utrzymuje inny potencjał.

Aby zrozumieć funkcję kanałów jonowych bramkowanych napięciem w żywej komórce, musimy zastanowić się, co jest czynnikiem kontrolującym potencjał błonowy. Prostą odpowiedzią jest to, że kanały jonowe kontrolują się same, a zmiana potencjału błonowego jest wynikiem zamykania i otwierania tych kanałów. Taka pętla kontrolna, kanały jonowe → potencjał błonowy → kanały jonowe, jest zjawiskiem podstawowym we wszelkiej sygnalizacji elektrycznej w komórkach. Skoro już zobaczyliśmy, jak potencjał błonowy może regulować kanały jonowe, omówimy obecnie, w jaki sposób kanały jonowe mogą kontrolować potencjał błonowy. W ostatniej części tego rozdziału zastanowimy się nad działaniem takiej kontrolnej pętli w całości.

Pytanie 12-5. Rysunek P12-5 pokazuje zapis doświadczenia wykonanego techniką patch-clamp, w którym prąd elektryczny przechodzący przez łatkę błony mierzono jako funkcję czasu. Łatka błony została oderwana z błony komórkowej komórki mięśniowej metodą pokazaną na rys. 12-20 i zawiera cząsteczki receptora acetylocholinowego, który jest kanałem kationowym bramkowanym ligandem i który otwiera się po związaniu acetylocholiny do zewnątrzkomórkowej powierzchni białka kanału. Aby uzyskać ten zapis, acetylocholinę dodano do roztworu wypełniającego mikroelektrodę. Opisz, czego możesz się z tego zapisu dowiedzieć o kanałach. Jak zmieniłby się zapis, gdyby acetylocholinę a) opuszczono lub b) dodano tylko do roztworu po zewnętrznej stronie mikroelektrody?



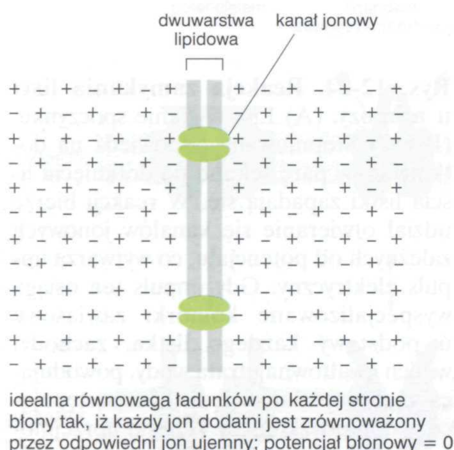
Rys. P12-5

Potencjałem błonowym rządzi przepuszczalność błony dla specyficznych jonów

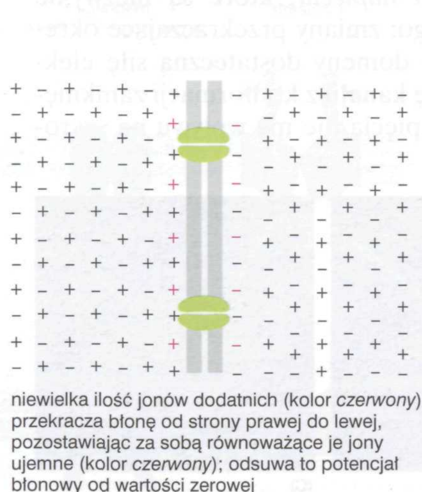
Różnica potencjału elektrycznego, czyli **potencjał błonowy**, występuje w poprzek błony komórkowej wszystkich komórek. Aby zrozumieć jego powstawanie, dużą pomocą będzie przypomnienie pewnych podstawowych zasad zjawiska elektryczności.

Gdy elektryczność w metalach jest przenoszona przez elektrony, to elektryczność w roztworach wodnych jest niesiona przez jony naładowane albo dodatnio (kationy), albo ujemnie (aniony). Przepływ jonów poprzez błonę komórkową wykrywa się jako prąd elektryczny, a akumulację jonów, jeśli nie są dokładnie zrównoważone akumulacją jonów o przeciwnym ładunku, wykrywa się jako nagromadzenie ładunku elektrycznego, czyli potencjału błonowego (rys. 12-25).

Aby zobaczyć, jak potencjał błonowy jest budowany i podtrzymywany, należy rozważyć ruchy jonów do typowej komórki zwierzęcej i z niej na zewnątrz, zachodzące w niewystymulowanym stanie „spoczynkowym". Ujemne ładunki występujące na cząsteczkach organicznych zawartych w obrębie komórki są w dużym stopniu zrównoważone przez K^+, dominujący w komórce jon dodatni. Duże wewnątrzkomórkowe stężenie K^+ jest częściowo efektem działania pompy Na^+-K^+, która aktywnie pompu-

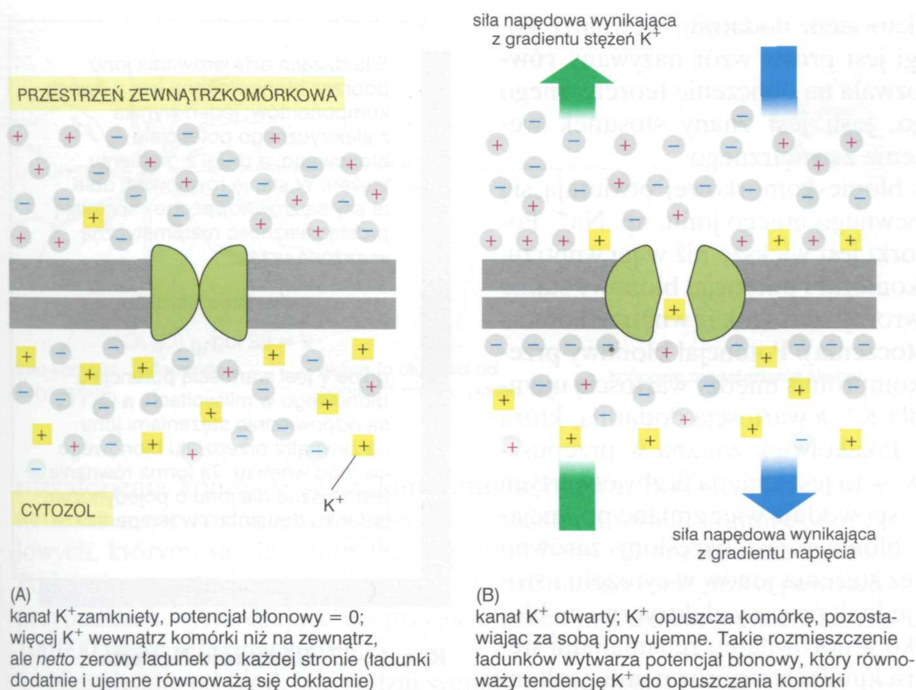


idealna równowaga ładunków po każdej stronie błony tak, iż każdy jon dodatni jest zrównoważony przez odpowiedni jon ujemny; potencjał błonowy = 0



niewielka ilość jonów dodatnich (kolor *czerwony*) przekracza błonę od strony prawej do lewej, pozostawiając za sobą równoważące je jony ujemne (kolor *czerwony*); odsuwa to potencjał błonowy od wartości zerowej

Rys. 12-25. Rozmieszczenie jonów powodujące powstanie potencjału błonowego. Potencjał błonowy jest wynikiem tworzenia się tuż przy błonie cienkiej (mniej niż 1 nm) warstwy jonów, utrzymywanej w tym miejscu przez ich przyciąganie elektryczne do znajdujących się po drugiej stronie błony odwrotnie naładowanych jonów partnerskich. Liczba jonów, które muszą ulec przemieszczeniu poprzez błonę, aby wytworzyć potencjał błonowy, stanowi maleńką frakcję wszystkich obecnych jonów. (6000 jonów K^+ przechodzących przez 1 μm^2 błony komórkowej wystarcza do przesunięcia potencjału błonowego o ok. 100 miliwoltów; ilość jonów K^+ znajdująca się w 1 μm^3 cytoplazmy jest 70000 razy większa)



(A)
kanał K⁺zamknięty, potencjał błonowy = 0; więcej K⁺ wewnątrz komórki niż na zewnątrz, ale *netto* zerowy ładunek po każdej stronie (ładunki dodatnie i ujemne równoważą się dokładnie)

(B)
kanał K⁺ otwarty; K⁺ opuszcza komórkę, pozostawiając za sobą jony ujemne. Takie rozmieszczenie ładunków wytwarza potencjał błonowy, który równoważy tendencję K⁺ do opuszczania komórki

Rys. 12-26. Rola K⁺ w generowaniu potencjału błonowego w poprzek błony komórkowej. Wychodząc z hipotetycznej sytuacji, w której potencjał błonowy ma wartość zerową, K⁺ będzie miał tendencję do opuszczania komórki, przechodząc zgodnie ze swym gradientem stężenia przez spoczynkowe (przeciekowe) kanały K⁺. Przy założeniu, że błona nie zawiera otwartych kanałów przepuszczalnych dla innych jonów, jony K⁺ przejdą przez błonę, ale nie będą im mogły towarzyszyć jony ujemne. Wynikiem tego będzie nadmiar ładunków dodatnich na zewnętrznej stronie błony, a ładunków ujemnych po stronie wewnętrznej. Powoduje to wzrost potencjału błonowego, który będzie dążył do kierowania K⁺ z powrotem. W stanie równowagi efekt gradientu stężeń K⁺ jest dokładnie zrównoważony efektem potencjału błonowego, przez co nie zachodzi żaden ruch K⁺ netto

je K⁺ do komórki. Prowadzi to do dużych różnic stężenia K⁺ po obu stronach błony komórkowej, przy czym stężenie K⁺ w komórce jest znacznie większe niż poza nią. Jednakże błona komórkowa zawiera także specyficzne kanały K⁺ znane jako *spoczynkowe (przeciekowe) kanały K⁺*. Kanały te w sposób przypadkowy ustawicznie oscylują między stanem otwartym i zamkniętym bez względu na warunki panujące w środku i na zewnątrz komórki, a gdy są otwarte, umożliwiają swobodne przechodzenie K⁺. W komórce znajdującej się w stanie spoczynkowym są one głównymi kanałami otwartymi w błonie komórkowej i przez to sprawiającymi, że spoczynkowa błona komórkowa jest znacznie bardziej przepuszczalna dla K⁺ niż dla innych jonów.

K⁺ będzie miał tendencję do wypływania przez te kanały z komórki zgodnie z jego stromym gradientem stężeń. Jednakże jakiekolwiek przeniesienie dodatniego ładunku na zewnątrz pozostawi wewnątrz komórki niezrównoważony ładunek ujemny i wytworzy przez to pole elektryczne, czyli potencjał błonowy, który będzie przeciwdziałał dalszemu wychodzeniu K⁺ z komórki. W ciągu mniej więcej milisekundy ustalą się warunki równowagi, w których potencjał błonowy jest dostatecznie silny, aby przeciwdziałać tendencji K⁺ do przemieszczania się zgodnie z jego gradientem stężeń — to jest, w której elektrochemiczny gradient K⁺ jest równy zeru, nawet jeżeli stężenie K⁺ jest nadal znacznie większe wewnątrz komórki niż poza nią (rys. 12-26).

Spoczynkowy potencjał błonowy jest potencjałem błonowym w warunkach ustabilizowanych, w których przepływ dodatnich i ujemnych jonów poprzez błonę komórkową jest precyzyjnie zrównoważony, tak iż nie następuje żadna dalsza akumulacja różnic ładunku w poprzek błony. Miarą potencjału błonowego jest napięcie istniejące w poprzek błony. W komórkach zwierzęcych wartość spoczynkowego potencjału błonowego mieści się między –20 a –200 miliwoltów (mV), zależąc od typu organizmu i komórki. Wyrażany jest jako wartość ujemna, ponieważ wewnątrz komórki ładunków ujemnych jest nieco więcej niż ładunków dodatnich. Aktualna wartość spoczynkowego potencjału błonowego w komórkach zwierzęcych jest głównie odbiciem gradientu stężeń K⁺ w poprzek błony komórkowej, ponieważ w stanie spoczynkowym błona ta jest głównie przepuszczalna

dla K^+, który jest zarazem głównym kationem dodatnim wewnątrz komórki. Ilościowym wyrazem równowagi jest prosty wzór nazywany **równaniem Nernsta** (rys. 12-27), który pozwala na obliczenie teoretycznego spoczynkowego potencjału błonowego, jeśli jest znany stosunek wewnętrznego stężenia jonów do ich stężenia zewnętrznego.

Załóżmy teraz, że w spoczynkowej błonie komórkowej otwierają się nagle inne kanały przepuszczalne dla pewnego innego jonu, np. Na^+. Ponieważ stężenie Na^+ na zewnątrz komórki jest większe niż w jej wnętrzu, Na^+ będzie przez te kanały wnikał do komórki i potencjał błonowy stanie się mniej ujemny, a nawet przyjmie odwrotny znak (tak iż wnętrze komórki będzie dodatnie w stosunku do jej otoczenia). Potencjał błonowy przesunie się ku nowej wartości, którą jest kompromis między wartością ujemną, jaka odpowiadałaby równowadze dla K^+, a wartością dodatnią, która odpowiadałaby równowadze dla Na^+. Jakakolwiek zmiana w przepuszczalności błony dla specyficznych jonów — to jest zmiana liczby otwartych kanałów jonowych różnych rodzajów — spowoduje więc zmianę potencjału błonowego. Dlatego też potencjał błonowy jest określony zarówno przez stan kanałów jonowych, jak i przez stężenia jonów w cytozolu i środowisku pozakomórkowym. Ponieważ jednak procesy elektryczne na błonie komórkowej zachodzą bardzo szybko w porównaniu ze zmianami stężeń jonów w całej masie płynu — w milisekundach w porównaniu z sekundami lub minutami — to najważniejsze w kontrolowaniu potencjału błonowego są kanały jonowe.

Aby zobaczyć, jak układ sił pomiędzy potencjałem błonowym a kanałami jonowymi jest używany w sygnalizacji elektrycznej, przejdziemy od zachowania się jonów i kanałów jonowych do zachowania się całych komórek. Jako najważniejszy przykład weźmiemy komórki nerwowe, ponieważ wyspecjalizowały się one bardziej niż jakiekolwiek inne typy komórek w sygnalizacji elektrycznej i wykorzystały w tym celu kanały jonowe w najbardziej przemyślne sposoby.

Siła dążąca do kierowania jonu poprzez błonę złożona jest z dwóch komponentów: jeden wynika z elektrycznego potencjału błonowego, a drugi z gradientu stężeń. W stanie równowagi obie te siły są zrównoważone i spełniają prostą zależność matematyczną wyrażoną przez:

równanie Nernsta

$$V = 62 \log_{10} (C_o / C_i)$$

gdzie V jest wartością potencjału błonowego w miliwoltach, a C_o i C_i są odpowiednio stężeniami jonu na zewnątrz przedziału błonowego i w jego wnętrzu. Ta forma równania jest słuszna dla jonu o pojedynczym ładunku dodatnim i w temperaturze 37°C

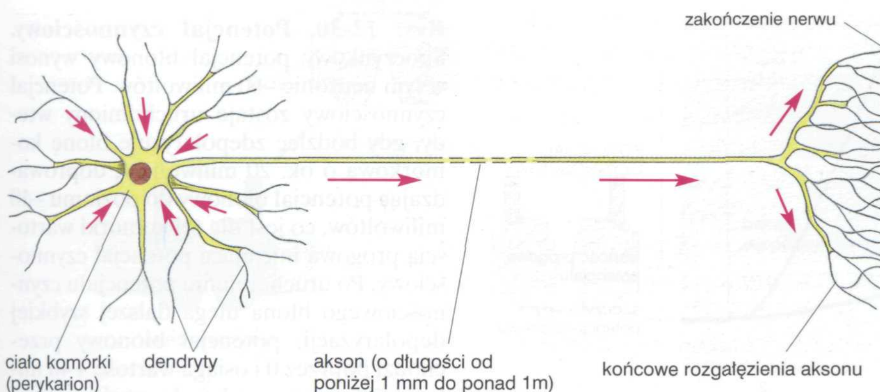
Rys. 12-27. Równanie Nernsta

Pytanie 12-6. Ze stężeń podanych w tab. 12-1 (s. 373) oblicz równowagowy potencjał błonowy K^+ i Na^+ (przyjmij, że wewnątrzkomórkowe stężenie Na^+ jest 10 mM). Jakiego potencjału błonowego należy się spodziewać w spoczynkowym stanie komórki? Wyjaśnij swoją odpowiedź. Co by się stało, gdyby nagle otworzyła się wielka liczba kanałów Na^+, czyniąc błonę bardziej przepuszczalną dla Na^+ niż dla K^+? (Zwróć uwagę, że już niewielka ilość przechodzących jonów drastycznie zmieni rozmieszczenie ładunków poprzez błonę i dlatego powinieneś przyjąć, że stężenia jonów po każdej stronie błony nie zmienią się w sposób znaczący). Co według ciebie nastąpiłoby, gdyby kanały Na^+ zamknęły się z powrotem?

Kanały jonowe i sygnalizacja w komórkach nerwowych

Podstawowym zadaniem komórki nerwowej, czyli **neuronu**, jest przyjmowanie, przewodzenie i przekazywanie sygnałów. Neurony przewodzą sygnały dośrodkowo z narządów zmysłów do ośrodkowego układu nerwowego, który składa się z mózgu i rdzenia kręgowego. W układzie tym sygnały przechodzą z jednego neuronu do drugiego przez niezwykle skomplikowane sieci informacyjne, a to w celu analizowania i interpretowania sygnałów dochodzących z narządów zmysłów oraz odpowiadania na te sygnały. Neurony wyprowadzają z ośrodkowego układu nerwowego na zewnątrz długie wypustki, po których przesyłają sygnały do działania mięśni i gruczołów. Pełnienie tych funkcji wymaga często niezwykłego wydłużenia neuronów: na przykład, neurony motoryczne człowieka przewodzące sygnały z rdzenia kręgowego do mięśni stopy mogą sięgać jednego metra długości.

Każdy neuron składa się z *ciała komórki — perykarionu* (zawierającego jądro), z którego promieniście rozchodzą się długie i cienkie wypustki. Zwykle jedna z nich stanowi długi **akson** przewodzący sygnały odśrodkowo od perykarionu do odległych komórek docelowych, a liczne krótkie, rozgałęzione *dendryty* wystają z perykarionu jak anteny i tworzą powiększoną powierzchnię do przyjmowania sygnałów z aksonów innych neuronów (rys. 12-28). Zazwyczaj akson na samym końcu dzieli się na liczne



Rys. 12-28. Neurony. Schemat budowy typowego neuronu. *Czerwone strzałki* zaznaczają kierunek przewodzenia sygnałów. Pojedynczy akson odprowadza sygnały od ciała komórki (perykarionu), natomiast liczne dendryty przejmują sygnały z aksonów innych neuronów

rozgałęzienia kończące się **zakończeniem nerwu**, przez co przesłanie neuronu może zostać równocześnie przekazane do wielu komórek docelowych, którymi są albo inne neurony, albo komórki mięśni i gruczołów. Podobnie rozgałęzienie dendrytów może być bardzo rozległe i w pewnych przypadkach wystarczające do przyjęcia przez pojedynczy neuron aż do 100000 wejść informacyjnych.

Niezależnie od tego, jaki rodzaj sygnału niesie neuron — czy będzie to informacja wzrokowa z oka, czy polecenie motoryczne do mięśnia, czy etap analizy sygnału w mózgu — forma sygnału jest zawsze taka sama: składają się na nią zmiany potencjału elektrycznego w poprzek błony komórkowej neuronu.

Potencjały czynnościowe umożliwiają szybkie komunikowanie się na duże odległości

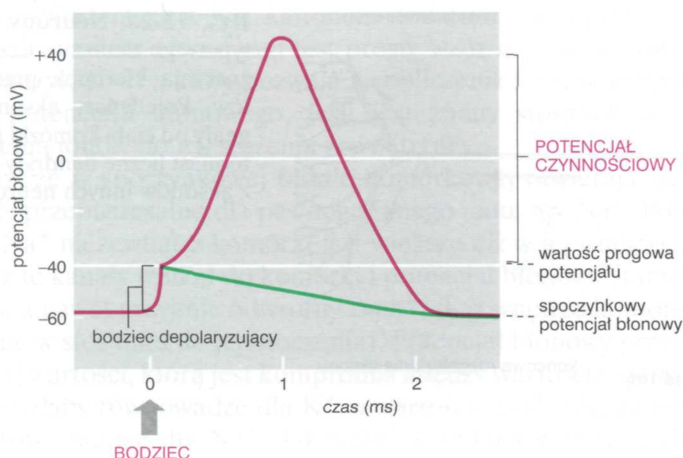
Neuron jest stymulowany przez sygnał — zazwyczaj z innego neuronu — doprowadzony do określonego miejsca na powierzchni komórki. Sygnał ten wywołuje w tym miejscu zmianę potencjału błonowego. Jednak aby sygnał mógł być przenoszony dalej, zmiana potencjału błonowego musi się z tego miejsca — będącego zwykle na dendrycie lub perykarionie — rozszerzyć tak, by dotrzeć do zakończeń aksonu, które dopiero przekazują sygnał do następnych komórek danej drogi nerwowej. Aczkolwiek miejscowa zmiana potencjału błonowego będzie rozszerzać się biernie wzdłuż aksonu lub dendrytu na przylegające obszary błony komórkowej, to jednak będzie ona słabnąć w miarę oddalania się od źródła. Osłabianie to nie jest ważne przy krótkich odległościach, ale przy przesyłaniu na duże odległości takie *bierne rozprowadzanie* jest niewystarczające. W ten sam sposób sygnał telefoniczny może być przeniesiony bez wzmocnienia na krótkie odległości przez przewody twojego miasta, ale przekazanie go przez ocean podwodnym kablem wymaga odcinkowego wzmacniania.

Neurony rozwiązały ten problem przez zastosowanie mechanizmu sygnalizacji aktywnej: lokalny bodziec elektryczny o dostatecznej sile wyzwala w błonie komórkowej eksplozję aktywności elektrycznej, która jest bardzo szybko rozprowadzana wzdłuż błony aksonu będąc wzdłuż całej drogi podtrzymywana przez automatyczne odnawianie. Ta wędrująca fala pobudzenia elektrycznego znana jako **potencjał czynnościowy** lub *impuls nerwowy* może przenosić zawartość informacyjną bez osłabiania sygnału z jednego końca na drugi z szybkością do 100 metrów na sekundę.

Wszystkie wcześniejsze badania wyjaśniające mechanizm sygnalizacji elektrycznej wzdłuż aksonu nerwowego były wykonane na ogromnym aksonie mątwy (rys. 12-29), który ma średnicę dostatecznie dużą, aby moż-



Rys. 12-29. Mątwa *Loligo*. Zwierzę to ma dużą komórkę nerwową o ogromnym aksonie, który pozwala mątwie bardzo szybko reagować w przypadku wystąpienia zagrożenia w jej otoczeniu. Na długo przed tym, zanim technika patch-clamp pozwoliła na rejestrowanie aktywności pojedynczego kanału w małych komórkach, naukowcy mogli rejestrować prądy czynnościowe w ogromnym aksonie mątwy i wnioskować stąd o istnieniu kanałów jonowych w błonach. (Dzięki uprzejmości: Howard Hall © Oxford Scientific Films)



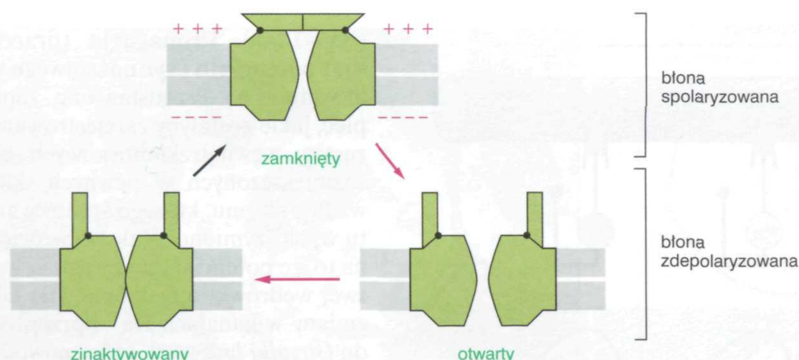
Rys. 12-30. Potencjał czynnościowy. Spoczynkowy potencjał błonowy wynosi w tym neuronie –60 miliwoltów. Potencjał czynnościowy zostaje uruchomiony wtedy, gdy bodziec zdepolaryzuje błonę komórkową o ok. 20 miliwoltów, doprowadzając potencjał błonowy do poziomu –40 miliwoltów, co jest dla tej komórki wartością progową inicjującą potencjał czynnościowy. Po uruchomieniu potencjału czynnościowego błona ulega dalszej szybkiej depolaryzacji: potencjał błonowy przechodzi poprzez 0 i osiąga wartość +40 miliwoltów, zanim wróci do swej ujemnej wartości spoczynkowej, gdy zakończy się potencjał czynnościowy. *Krzywa zielona* pokazuje, jak — po początkowym bodźcu depolaryzującym — potencjał błonowy uległby po prostu relaksacji z powrotem do wartości spoczynkowej, gdyby w błonie komórkowej nie było kanałów jonowych bramkowanych napięciem

na w nią bezpośrednio wprowadzić elektrodę i mierzyć jego aktywność elektryczną. Z takich badań wywnioskowano, że potencjały czynnościowe są bezpośrednią konsekwencją właściwości kanałów jonowych bramkowanych napięciem (patrz rys. 12-22A) w błonie komórkowej nerwu, co zaraz wyjaśnimy.

Potencjały czynnościowe są z reguły wynikiem działania kanałów Na^+ bramkowanych napięciem

Bodźcem wyzwalającym potencjał czynnościowy w neuronie jest z reguły gwałtowna miejscowa *depolaryzacja* błony komórkowej — to jest przesunięcie potencjału błonowego do wartości mniej ujemnej. Później omówimy, w jaki sposób za taką depolaryzację jest odpowiedzialne działanie cząsteczek sygnałowych — *przekaźników nerwowych* — wydzielanych przez inny neuron. Bodziec, który wywołuje depolaryzację dostatecznie silną, aby przekroczyła odpowiednią wartość progową, powoduje w tym miejscu natychmiastowe otwarcie na krótki czas **kanałów Na^+ bramkowanych napięciem**, co umożliwia wniknięcie do komórki małej ilości Na^+ zgodnie z gradientem elektrochemicznym tego jonu. Wejście ładunku dodatniego pociąga za sobą dalszą depolaryzację błony (to jest jeszcze bardziej zmniejsza ujemny charakter potencjału błonowego) powodując przez to otwarcie dalszych kanałów Na^+ bramkowanych napięciem, co wprowadza do komórki dalsze jony Na^+ i wywołuje dalszą depolaryzację. Proces ten postępuje w sposób samowzmacniający się aż — w czasie ok. milisekundy — potencjał błonowy w lokalnym obszarze błony nie przesunie swej spoczynkowej wartości z ok. –60 mV do ok. +40 mV (rys. 12-30). Ta ostatnia wartość jest bliska potencjałowi błonowemu, przy którym siła elektrochemiczna napędzająca ruch Na^+ poprzez błonę stanowi zero — a więc, przy której efekty potencjału błonowego i gradientu stężeń Na^+ są sobie równe i przeciwstawne, przez co Na^+ traci tendencję do opuszczania komórki lub wejścia do niej. W takim momencie komórka zostałaby unieruchomiona z wszystkimi kanałami Na^+ bramkowanymi napięciem pozostającymi głównie w stanie otwartym, gdyby kanały bez końca reagowały w ten sam sposób na zmieniony potencjał błonowy.

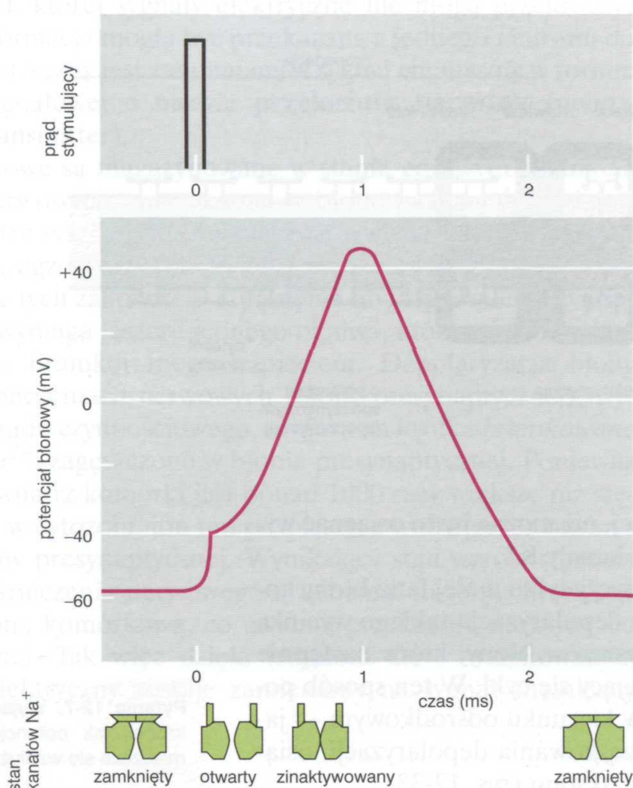
Komórka jest jednak ochroniona przed taką sytuacją, ponieważ kanały Na^+ mają automatyczny mechanizm inaktywujący, narzucający im bardzo szybko (po ok. milisekundzie) przyjęcie specjalnej konformacji nieaktywnej, w której kanał nie jest zdolny do powtórnego otwarcia: nawet jeśli błona jest nadal zdepolaryzowana, kanały Na^+ pozostaną w tym *zinak-*



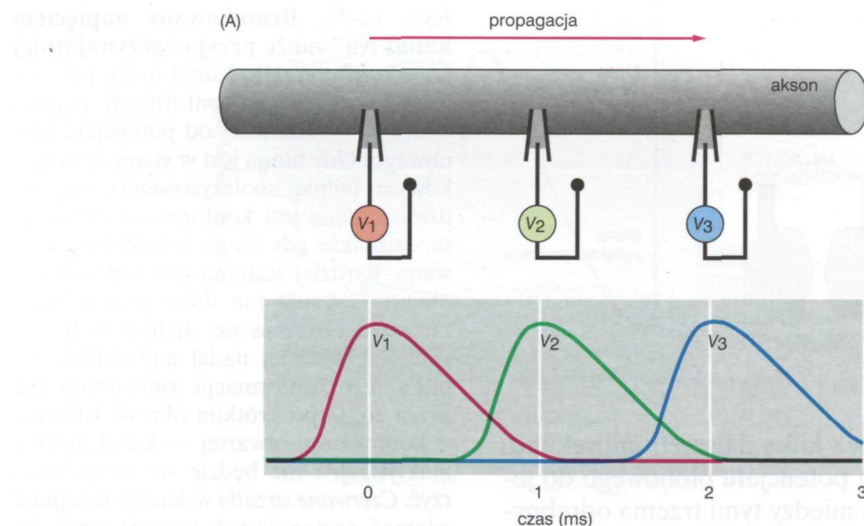
Rys. 12-31. **Bramkowany napięciem kanał Na^+ może przyjąć przynajmniej trzy konformacje.** Kanał może przestawiać się z jednej konformacji (stanu) w drugą w zależności od potencjału błonowego. Gdy błona jest w stanie spoczynkowym (silnie spolaryzowana), najbardziej stabilna jest konformacja zamknięta. Jednakże gdy błona jest zdepolaryzowana, bardziej stabilna jest konformacja otwarta i kanał ma duże prawdopodobieństwo otwarcia się. Jednak w błonie zdepolaryzowanej nadal najbardziej stabilna jest konformacja zinaktywowana, przez co — po krótkim okresie istnienia w konformacji otwartej — kanał ulegnie inaktywacji i nie będzie się mógł otworzyć. *Czerwone strzałki* wskazują kolejność zdarzeń następujących po raptownej depolaryzacji, a *czarne strzałki* zaznaczają powrót do konformacji wyjściowej, po repolaryzacji błony

tywowanym stanie i będą w nim trwały przez kilka dalszych milisekund, które muszą upłynąć od momentu powrotu potencjału błonowego do jego wyjściowej ujemnej wartości. Zależności między tymi trzema odrębnymi stanami kanału Na^+ bramkowanego napięciem — *zamkniętym, otwartym* i *zinaktywowanym* — przedstawiono schematycznie na rys. 12-31. Z kolei sposób, w jaki te stany przyczyniają się do wzrostu i spadku potencjału czynnościowego, pokazano na rys. 12-32.

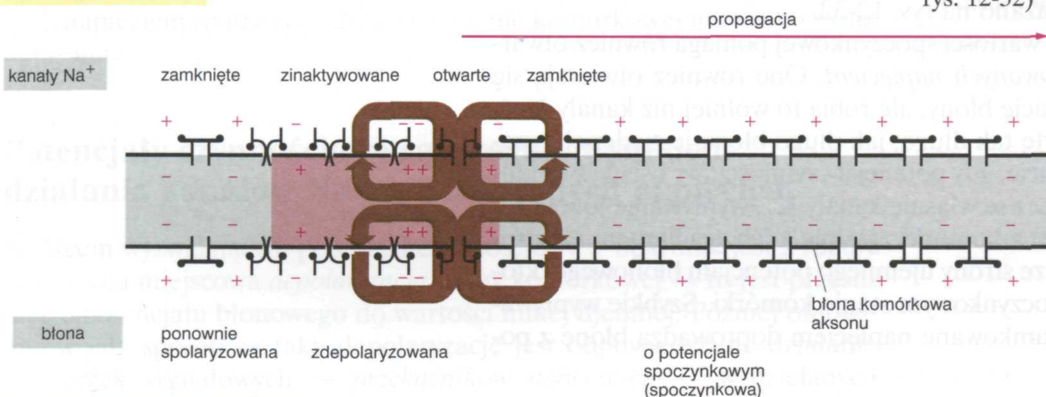
W powrocie błony do jej wartości spoczynkowej pomaga również otwarcie się *kanałów K^+ bramkowanych napięciem*. One również otwierają się w odpowiedzi na depolaryzację błony, ale robią to wolniej *niż* kanały Na^+, a poza tym pozostają otwarte tak długo, jak długo błona jest zdepolaryzowana. Dlatego też w momencie, gdy potencjał czynnościowy osiąga swą kulminację, rozpoczyna się, przez te właśnie kanały K^+, wypływanie jonów K^+ (niosących ładunek dodatni) z komórki zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym bez przeszkód ze strony ujemnego potencjału błonowego, który taki ruch ogranicza w spoczynkowym stanie komórki. Szybkie wypływanie K^+ przez kanały K^+ bramkowane napięciem doprowadza błonę z po-

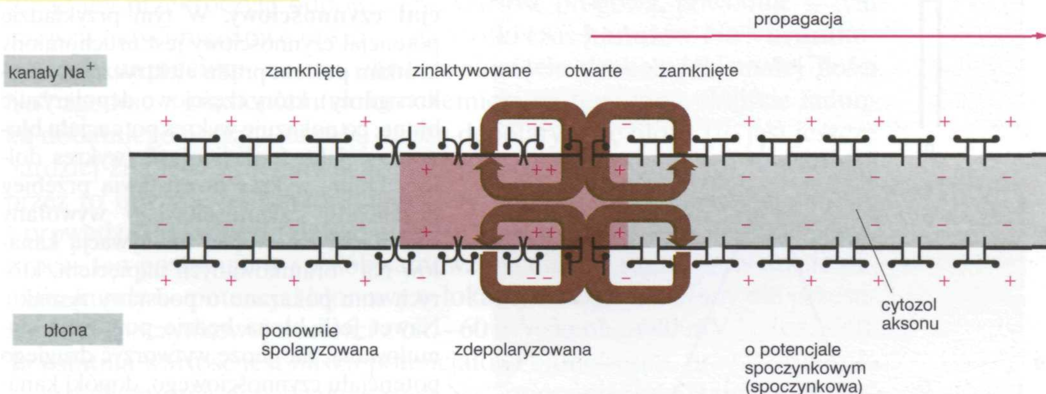


Rys. 12-32. **Przepływy jonów a potencjał czynnościowy.** W tym przykładzie potencjał czynnościowy jest uruchomiony krótkim pulsem prądu elektrycznego (wykres górny), który częściowo depolaryzuje błonę, co pokazuje wykres potencjału błonowego jako funkcji czasu (wykres dolny). Dolny wykres przedstawia przebieg potencjału czynnościowego wywołany otwarciem i następną inaktywacją kanałów Na^+ bramkowanych napięciem, których stan pokazano u podstawy rysunku. Nawet jeśli błona będzie ponownie stymulowana, nie może wytworzyć drugiego potencjału czynnościowego, dopóki kanały Na^+ nie powrócą z konformacji zinaktywowanej do prostej konformacji zamkniętej (patrz rys. 12-31); aż do tego momentu błona jest oporna wobec stymulacji (okres refrakcji)



(B)



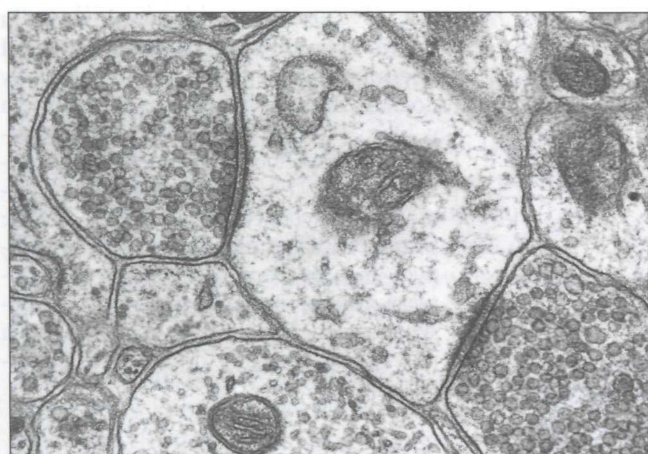


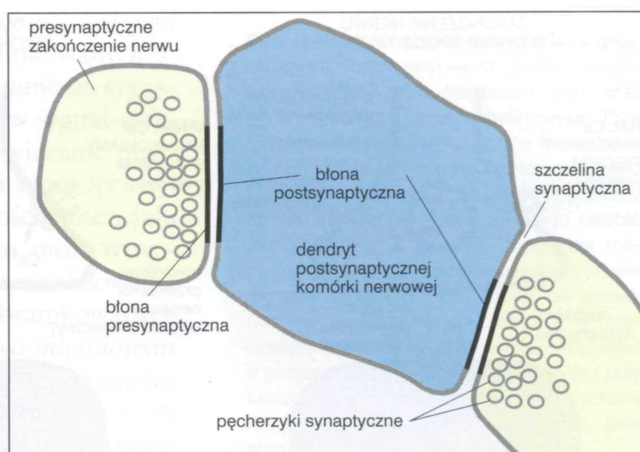
Rys. 12-33. Propagacja (przechodzenie) potencjału czynnościowego wzdłuż aksonu. (A) Przedstawiono zapisy napięć, jakie zostałyby zarejestrowane przez zestaw wewnątrzkomórkowych elektrod rozmieszczonych w pewnych odstępach wzdłuż aksonu, którego średnicę znacznie tu wyolbrzymiono. Należy zwrócić uwagę na to, że potencjał czynnościowy w trakcie swej wędrówki nie słabnie. (B) Ukazano zmiany w kanałach Na^+ i przepływy prądu (*strzałki brązowe*), które powodują powstanie przemieszczających się zakłóceń potencjału błonowego. Obszar aksonu o błonie zdepolaryzowanej zabarwiono na *różowo*. Potencjał czynnościowy może wędrować tylko odśrodkowo od miejsca depolaryzacji (a więc ku zakończeniu aksonu), ponieważ inaktywacja kanałów Na^+ zapobiega cofaniu się depolaryzacji (w kierunku perykarionu) (patrz także rys. 12-32)

wrotem do jej stanu spoczynkowego szybciej, niż można by to osiągnąć wypływem K^+ przez same tylko spoczynkowe kanały K^+.

Tak opisany potencjał czynnościowy dotyczy tylko małej łatki błony komórkowej. Jednak samowzmacniająca się depolaryzacja takiego wycinka wystarcza do depolaryzacji sąsiednich obszarów błony, które następnie przechodzą przez taki sam samowzmacniający się cykl. W ten sposób potencjał czynnościowy rozprzestrzenia się w kierunku odśrodkowym — jako rodzaj fali stojącej — z miejsca zapoczątkowania depolaryzacji, osiągając jako prąd czynnościowy zakończenia aksonu (rys. 12-33).

Pytanie 12-7. Wyjaśnij w 100 słowach lub krócej, jak potencjał czynnościowy przemieszcza się wzdłuż aksonu.



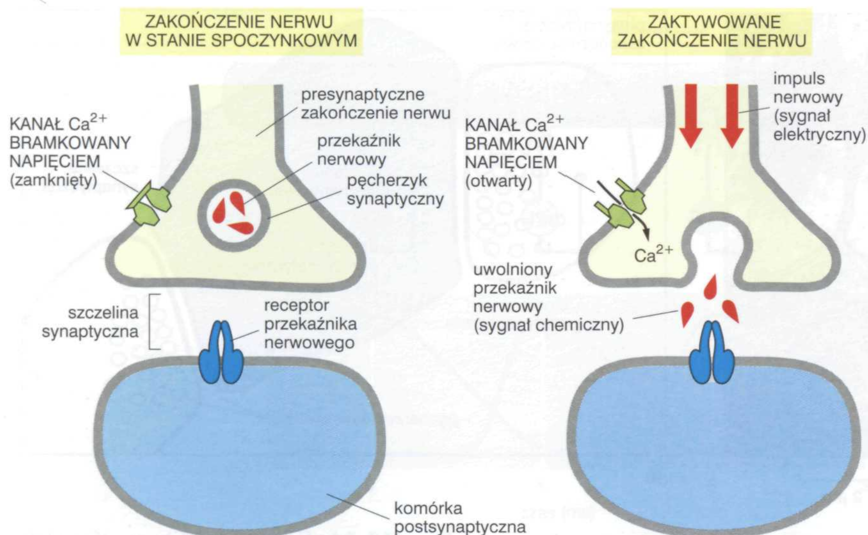


Rys. 12-34. Synapsy. Mikrografia elektronowa (A) i rysunek (B) poprzecznego przekroju dwóch zakończeń nerwów (kolor *żółty*), tworzących synapsy na pojedynczym dendrycie (kolor *niebieski*) komórki nerwowej w mózgu ssaka. Zauważ, że zarówno presynaptyczne, jak i postsynaptyczne błony są w synapsie pogrubiałe. (A dzięki uprzejmości: Cedric Raine)

Kanały Ca^{2+} bramkowane napięciem zamieniają przy zakończeniach nerwowych sygnały elektryczne w sygnały chemiczne

Gdy prąd czynnościowy sięgnie końca aksonu — *zakończeń nerwowych* — sygnał musi zostać w jakiś sposób przekazany do *komórek docelowych*, kontaktujących się z tymi zakończeniami nerwowymi, a które są zazwyczaj komórkami nerwowymi lub mięśniowymi. Sygnały są przekazywane w wyspecjalizowanych miejscach kontaktu znanych jako **synapsy**. W większości synaps błony komórkowe komórek przekazujących i odbierających sygnał — a więc, odpowiednio, komórek *presynaptycznych* i *postsynaptycznych* — są oddzielone od siebie wąską *szczeliną synaptyczną* (zazwyczaj o szerokości 20 nm), której sygnały elektryczne nie mogą przekroczyć (rys. 12-34). Aby informacja mogła być przekazana z jednego neuronu do drugiego, sygnał elektryczny jest zamieniany w sygnał chemiczny w formie małej cząsteczki sygnałowej o nazwie **przekaźnik nerwowy** (neuroprzekaźnik, neurotransmitter).

Przekaźniki nerwowe są magazynowane w stanie gotowym do użycia w zakończeniach nerwowych, zagęszczone w błonowych **pęcherzykach synaptycznych** (patrz rys. 12-34). Zostają one wydzielone z zakończeń nerwowych w drodze egzocytozy (omówionej w rozdz. 14), gdy tylko prąd czynnościowy sięgnie tych zakończeń. Połączenie między prądem czynnościowym a sekrecją wymaga jeszcze jednego ogniwa, którym jest inny typ kanału kationowego bramkowanego napięciem. Depolaryzacja błony komórkowej w zakończeniach nerwowych (błony presynaptycznej), wywołana dotarciem prądu czynnościowego, otwiera na krótko *bramkowane napięciem kanały* Ca^{2+}, zagęszczone w błonie presynaptycznej. Ponieważ stężenie Ca^{2+} na zewnątrz komórki jest ponad 1000 razy większe niż stężenie wolnego Ca^{2+} w cytozolu, jon ten pośpiesznie wnika przez otwarte kanały do cytoplazmy presynaptycznej. Wynikający stąd wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu zakończenia nerwowego uruchamia fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną komórkową, co uwalnia przekaźnik nerwowy do szczeliny synaptycznej. Tak więc dzięki kanałom Ca^{2+} bramkowanym napięciem sygnał elektryczny zostaje zamieniony na sygnał chemiczny (rys. 12-35).

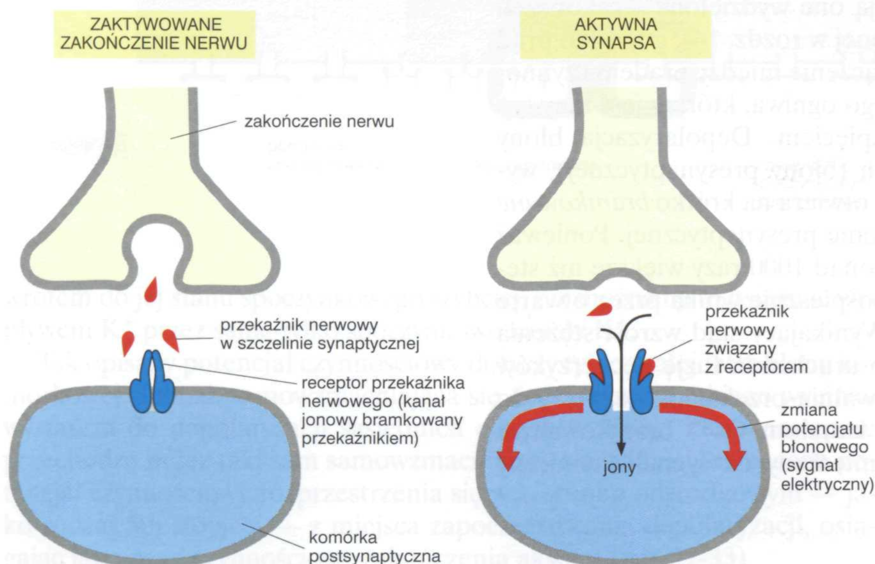


Rys. 12-35. Zamiana w zakończeniu nerwu sygnału elektrycznego w sygnał chemiczny. Gdy potencjał czynnościowy dociera do zakończenia nerwu, otwiera w błonie komórkowej kanały Ca^{2+} bramkowane napięciem, co umożliwia wpłynięcie Ca^{2+} do tego zakończenia (elementu presynaptycznego). Podwyższenie poziomu Ca^{2+} w elemencie presynaptycznym inicjuje fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną komórkową (błoną presynaptyczną), co uwalnia zawarty w nich przekaźnik nerwowy do szczeliny synaptycznej

Kanały bramkowane przekaźnikiem nerwowym zamieniają w komórce docelowej sygnały chemiczne z powrotem w sygnały elektryczne

Uwolniony przekaźnik nerwowy szybko dyfunduje w szczelinie synaptycznej i wiąże się z *receptorami przekaźników nerwowych*, zagęszczonymi w postsynaptycznej błonie komórki docelowej. Związanie przekaźnika nerwowego z jego receptorami powoduje zmianę potencjału błonowego komórki docelowej, która może w tej komórce doprowadzić do powstania potencjału czynnościowego. Przekaźnik nerwowy jest szybko usuwany, co zapewnia, że po powrocie komórki presynaptycznej w stan spoczynkowy komórka postsynaptyczna też utraci swą chwilową aktywność. Przekaźnik nerwowy jest usuwany czasem przez jego enzymatyczny rozkład w szczelinie synaptycznej, ale częściej przez pobranie zwrotne do zakończenia nerwowego lub do komórek sąsiednich.

Istnieją różnego typu receptory przekaźników nerwowych; pewne pośredniczą w powolnych efektach w komórce docelowej, a inne umożliwiają ich bardzo szybką odpowiedź. Odpowiedzi szybkie — w skali milisekund —



Rys. 12-36. Zamiana sygnału chemicznego w sygnał elektryczny dokonywana w synapsie przez kanały jonowe bramkowane przekaźnikiem nerwowym. Uwolniony przekaźnik nerwowy otwiera (po związaniu się z nimi) bramkowane przekaźnikiem kanały jonowe w błonie komórkowej komórki postsynaptycznej. Wynikający z tego przepływ jonów zmienia potencjał błonowy komórki postsynaptycznej, przez co sygnał chemiczny zostaje z powrotem zamieniony w sygnał elektryczny

są możliwe dzięki receptorom, które są *kanałami jonowymi bramkowanymi przez przekaźnik*. Są one podrodziną kanałów jonowych bramkowanych ligandem (patrz rys. 12-22B), a ich funkcją jest bezpośrednia zamiana sygnału chemicznego, niesionego przez przekaźnik, z powrotem w sygnał elektryczny. Kanały otwierają się na krótko w odpowiedzi na związanie przekaźnika nerwowego, powodując zmianę przepuszczalności błony postsynaptycznej dla jonów. To z kolei powoduje zmianę wartości potencjału błonowego (rys. 12-36); jeśli zmiana ta jest dostatecznie duża, może wywołać w komórce postsynaptycznej powstanie potencjału czynnościowego. Dobrze przebadanymi przykładami kanałów jonowych bramkowanych przez przenośniki są te, które występują w *złączu nerwowo-mięśniowym* (*płytce motorycznej*), wyspecjalizowanym typie synapsy powstałej pomiędzy neuronem a komórką mięśniową. U kręgowców przekaźnikiem nerwowym jest tu acetylocholina, a bramkowanym przez przenośnik kanałem jonowym jest *receptor acetylocholinowy typu N* przedstawiony już na rys. 12-18.

Pytanie 12-8. W chorobie myasthenia gravis organizm ludzki wytwarza przez pomyłkę przeciwciała wobec cząsteczek jego własnych receptorów acetylocholinowych. Przeciwciała te wiążą się na błonie komórkowej komórek mięśniowych z receptorami acetylocholiny i inaktywują je. Choroba ta prowadzi do postępującego wyniszczającego osłabienia pacjentów. Z początku mogą oni mieć trudności np. z otwieraniem powiek, a w zwierzęcym modelu choroby króliki nie potrafią utrzymać uszu w pozycji pionowej. W miarę postępu choroby słabnie większość mięśni, a pacjenci mają trudności w mówieniu i połykaniu. W końcu utrudnienia w oddychaniu mogą spowodować śmierć. Wyjaśnij, który etap pracy mięśnia został zakłócony.

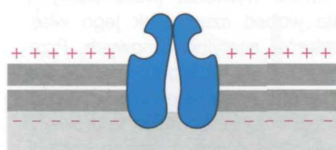
Neurony otrzymują zarówno pobudzające, jak i hamujące impulsy

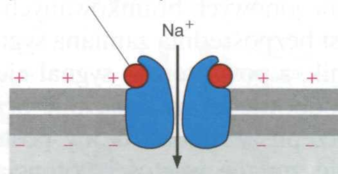
Odpowiedź wywołana w synapsie przez przekaźnik nerwowy może mieć charakter pobudzający lub hamujący. Pewne przekaźniki (wydzielane przez zakończenia aksonu *neuronów pobudzających*) powodują w komórce postsynaptycznej powstanie potencjału czynnościowego, natomiast inne (wydzielane przez zakończenia aksonu *neuronów hamujących*) zapobiegają powstaniu tych potencjałów w komórkach postsynaptycznych. Kurara, środek farmakologiczny, którego pochodne są używane przez chirurgów do zmniejszenia napięcia mięśniowego podczas operacji, wywołuje paraliż przez zablokowanie dotarcia pobudzających sygnałów do postsynaptycznej błony płytki nerwowo-mięśniowej*, natomiast trucizna strychnina wywołuje skurcze mięśniowe i śmierć w wyniku zablokowania docierania sygnałów hamujących.

Przekaźniki nerwowe pobudzające i hamujące wiążą się z odmiennymi receptorami i to właśnie charakter receptora decyduje, czy odpowiedzią będzie pobudzenie, czy zahamowanie. Receptorami dla przekaźników pobudzających, głównie *acetylocholiny* i *glutaminianu*, są kanały jonowe umożliwiające przepływ Na^+ i Ca^{2+}. Po związaniu neuroprzekaźnika kanały otwierają się, umożliwiając wpływanie głównie Na^+, który depolaryzuje błonę komórkową w kierunku progowej wartości potencjału wymaganej do powstania potencjału czynnościowego. Tak więc stymulacja tych receptorów prowadzi do aktywacji komórki postsynaptycznej. Natomiast receptory dla neuroprzekaźników hamujących, głównie kwasu γ-aminomasłowego (GABA) i glicyny, są zazwyczaj kanałami dla Cl^-. Po związaniu przekaźnika kanały otwierają się, wchodzi wtedy do komórki niewielka tylko ilość jonów Cl^-, ponieważ przy spoczynkowej wartości potencjału błonowego siła napędowa do przemieszczania Cl^- poprzez błonę jest bliska zeru. Jednakże gdy równocześnie są otwarte kanały Na^+, jony Na^+ wejdą szybko do komórki powodując odsunięcie potencjału błonowego od jego wartości spoczynkowej. Przesunięcie to spowoduje ruch Cl^- do wnętrza komórki, neutralizujący efekt wpłynięcia Na^+ (rys. 12-37). W ten sposób hamujące przekaźniki nerwowe tłumią powstawanie potencjału czynnościowego, czyniąc błonę komórki docelowej bardziej odporną na depolaryzację. Budowę chemiczną tych czterech przekaźników nerwowych przedstawiono w tab. 12-3.

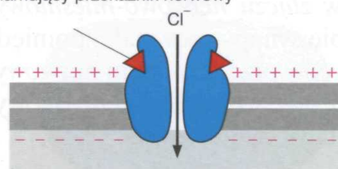
---

* Kurara i jej pochodne są antagonistycznymi ligandami receptora acetylocholinowego typu N (*przyp. tłum.*).









Rys. 12-37. Kontrast między sygnalizacją w synapsie pobudzającej i hamującej. Pobudzające przekaźniki nerwowe aktywują kanały jonowe umożliwiające przepływ Na^+ i Ca^{2+}, natomiast hamujące przekaźniki nerwowe aktywują kanały jonowe umożliwiające przepływ Cl^-

Miejscem działania wielu leków stosowanych w bezsenności, lękach, depresji i schizofrenii są synapsy mózgu i dużo z nich działa przez związanie się z kanałami jonowymi bramkowanymi przez przenośniki. Barbiturany i leki uspokajające, takie jak np. Valium, Halcion i Teamzepam, wiążą się z kanałami Cl^- bramkowanymi przez GABA. Ich związanie ułatwia otwieranie się kanałów pod wpływem GABA, przez co komórki są bardziej podatne na hamujący wpływ GABA. Odwrotnie, środek przeciwdepresyjny Prozac blokuje zwrotne pobranie przekaźnika pobudzającego, *serotoniny*, zwiększając przez to stężenie serotoniny w szczelinie synaptycznej. W jaki sposób ma to usuwać depresję, pozostaje nadal zagadką.

Istnieje bardzo dużo różnych typów receptorów przekaźników nerwowych, aczkolwiek należą one do niewielkiej tylko liczby rodzin. Na przykład jest wiele podtypów receptorów acetylocholiny, glutaminianu, GABA, glicyny i serotoniny; są one zazwyczaj rozmieszczone w różnych neuronach, a ich właściwości odróżniają się tylko nieznacznie. Przy takiej ogromnej różnorodności receptorów istnieje możliwość zaprogramowania nowej generacji leków psychoaktywnych, które działałyby bardziej selektywnie na określone układy neuronów, aby złagodzić przebieg chorób psychicznych, dewastujących życie wielu ludzi. Na przykład jeden procent populacji ludzkiej cierpi na schizofrenię, a następny jeden procent na depresję maniakalną.

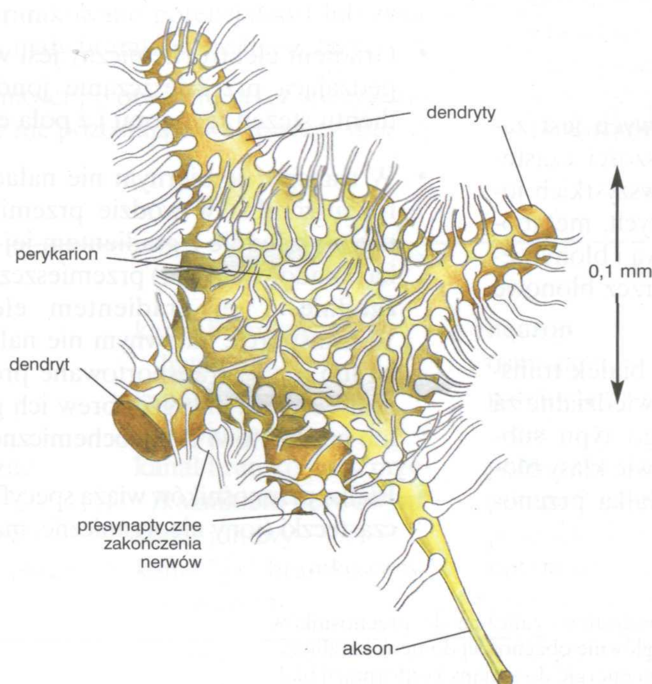
Tabela 12-3. Pewne przekaźniki nerwowe działające na kanały jonowe bramkowane ligandem

Przekaźnik nerwowy	Struktura	Działanie	Selektywność jonowa otwartego kanału
Acetylocholina	$H_3C-C(=O)-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$	pobudzające	Na^+ i Ca^{2+}
Glutaminian	$^-OOC-CH_2-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$	pobudzające	Na^+ i/lub Ca^{2+}
Kwas γ-aminomasłowy (GABA)	$^-OOC-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^+$	hamujące	Cl^-
Glicyna	$^-OOC-CH_2-NH_3^+$	hamujące	Cl^-

Połączenia synaptyczne umożliwiają nam myślenie, działanie i pamiętanie

W synapsie chemicznej zakończenie nerwowe komórki presynaptycznej zamienia sygnał elektryczny w chemiczny, a komórka postsynaptyczna przekształca sygnał chemiczny z powrotem w elektryczny. Ingerencja w te procesy, zarówno w kierunku pozytywnym, jak i negatywnym, ma dla nas istotne znaczenie praktyczne. Dlaczego jednak ewolucja wybrała taką pozornie nieefektywną drogę przekazywania sygnału elektrycznego? Bardziej korzystne wydawałoby się bezpośrednie połączenie elektryczne między komórkami pre- i postsynaptycznymi lub całkowite wyeliminowanie synapsy, a pozostawienie jednej ciągłej komórki.

Wartość synaps chemicznych wyjaśnia się, gdy popatrzymy na nie w kontekście całego układu nerwowego — ogromnej sieci neuronów, powiązanych wzajemnie wieloma rozgałęzionymi szlakami, wykonującej złożone obliczenia sytuacyjne, przechowującej pamięć i tworzącej plany działania. Aby pełnić te funkcje, neurony muszą nie tylko wytwarzać i przewodzić sygnały, ale także łączyć je, interpretować i zapisywać. Czynności te są możliwe dzięki synapsom chemicznym. Na przykład komórka motoryczna w rdzeniu kręgowym otrzymuje wejścia ze strony setek lub tysięcy innych neuronów, które wytwarzają na niej synapsy (rys. 12-38). Niektóre z tych sygnałów będą działały na neuron stymulująco, a inne hamująco. Komórka motoryczna musi scalić wszystkie otrzymywane informacje i albo zareagować budując potencjał czynnościowy wzdłuż aksonu w celu pobudzenia mięśnia, albo pozostać w stanie spoczynku. To zadanie scalenia ogromu informacji wchodzącej i podjęcia decyzji o informacji wyjściowej jest możliwe dzięki skomplikowanemu współdziałaniu różnych typów kanałów jonowych w błonie komórkowej neuronu. Każdy z setek typów neuronów naszego mózgu ma charakterystyczny dla siebie zestaw receptorów i kanałów jonowych, które umożliwiają komórce odpowiadanie w szczególny sposób na pewien zestaw wejść informacyjnych i przez to wykonywanie swojej wyspecjalizowanej pracy. Co więcej, kanały jonowe i inne molekularne składniki synapsy mogą ulegać długotrwałym modyfika-



Rys. 12-38. Synapsy na perykarionie i dendrytach neuronu motorycznego w rdzeniu kręgowym. Wiele tysięcy zakończeń nerwów tworzy na neuronie synapsy, doprowadzając z innych części organizmu sygnały kontrolujące powstawanie potencjałów czynnościowych wzdłuż aksonu tego neuronu

Tabela 12-4. Przykłady kanałów jonowych

Kanał jonowy	Typowe umiejscowienie	Funkcja
Spoczynkowy kanał K^+	błona komórkowa większości komórek zwierząt	podtrzymywanie spoczynkowego potencjału błonowego
$\Delta\psi$-zależny kanał Na^+	błona komórkowa aksonu komórki nerwowej	wytwarzanie potencjału czynnościowego
$\Delta\psi$-zależny kanał K^+	błona komórkowa aksonu komórki nerwowej	powrót błony do potencjału spoczynkowego po inicjacji potencjału czynnościowego
$\Delta\psi$-zależny kanał Ca^{2+}	błona komórkowa zakończenia komórki nerwowej (błona presynaptyczna)	stymulacja wydzielenia przekaźnika nerwowego
Receptor acetylocholinowy* (kanał Na^+ bramkowany acetylocholiną)	błona komórkowa komórek mięśniowych (w złączach nerwowo-mięśniowych)	pobudzająca sygnalizacja synaptyczna
Receptor GABA (kanał Cl^- bramkowany przez GABA)	błona komórkowa wielu neuronów (przy synapsach)	hamująca sygnalizacja synaptyczna
Kanał kationowy aktywowany przez stres	komórki rzęsate w uchu wewnętrznym	odbiór fal akustycznych

* W tym przypadku: receptor acetylocholinowy typu N, receptor jonotropowy (*przyp. tłum.*).

cjom zależnym od tego, jak były używane, i przez to zachowywać ślady przeszłych wydarzeń; w ten sposób są magazynowane w pamięci. Dlatego też kanały jonowe są centralnymi elementami mechanizmu, który umożliwia nam działanie, myślenie, odczuwanie, mówienie i — co najważniejsze — czytanie i zapamiętanie wszystkiego, co jest w tej książce zawarte.

Niektóre kanały jonowe omówione w tym rozdziale zestawiono w tab. 12-4.

Streszczenie

- Dwuwarstwa lipidowa błon komórkowych jest zasadniczo nieprzepuszczalna dla większości cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie i dla wszystkich jonów. Przenoszenie substancji odżywczych, metabolitów i jonów poprzez błonę komórkową i błony wewnątrzkomórkowe jest dokonywane przez błonowe białka transportujące.
- Błony komórki zawierają duży zestaw białek transportujących, z których każde jest odpowiedzialne za przenoszenie przez błonę określonego typu substancji rozpuszczonych. Wyróżnia się dwie klasy błonowych białek transportujących — białka przenośników* i białka kanałów.
- Gradient elektrochemiczny jest wypadkową siłą napędzającą przemieszczanie jonów złożoną z gradientu stężeń tego jonu i z pola elektrycznego.
- W transporcie biernym nie naładowana cząsteczka rozpuszczalna w wodzie przemieszcza się spontanicznie zgodnie z gradientem jej stężeń, a cząsteczka naładowana (jon) przemieszcza się spontanicznie zgodnie z jej gradientem elektrochemicznym. W transporcie aktywnym nie naładowana cząsteczka lub jon są transportowane procesem wymagającym dopływu energii wbrew ich gradientowi stężeń lub gradientowi elektrochemicznemu.
- Białka przenośników wiążą specyficzne rozpuszczone cząsteczki (jony nieorganiczne, małe cząsteczki orga-

* Autorzy wbrew powszechnie przyjętemu podziałowi zaliczają do przenośników również pompy, które różnią się od przenośników głównie obecnością domeny katalitycznej, np. hydrolizy ATP, i domeny zużywającej wolną energię do zmiany konformacji białka (*przyp. tłum.*).

niczne lub oba te typy razem) i przenoszą je poprzez dwuwarstwę lipidową w ten sposób, że ulegają zmianom konformacyjnym powodującym, iż miejsce wiążące przenoszoną substancję jest otwarte najpierw po jednej stronie błony, a następnie po drugiej.

- Przenośniki mogą działać jak pompy, transportując rozpuszczone substancje wbrew ich gradientowi elektrochemicznemu, używając do tego energii dostarczonej przez hydrolizę ATP, przez zgodny z gradientem przepływ jonów Na^+ lub H^+ albo przez światło.
- Pompa Na^+-K^+ w błonie komórkowej komórek zwierząt jest ATPazą, która aktywnie wyprowadza z komórki Na^+, a wprowadza do niej K^+ utrzymując w ten sposób w poprzek błony komórkowej stromy gradient Na^+, używany do zasilania innych procesów aktywnego transportu i do przewodzenia sygnałów elektrycznych.
- Białka kanałów tworzą pory wodne poprzez dwuwarstwę lipidową, przez które mogą dyfundować rozpuszczone substancje. O ile transport prowadzony przez przenośniki może być czynny lub bierny, o tyle transport przez kanały jest zawsze bierny.
- Większość białek tworzących kanały jest selektywnymi kanałami jonowymi, które pozwalają na przejście nieorganicznych jonów o określonej wielkości i ładunku w poprzek błony zgodnie z ich gradientami elektrochemicznymi. Transport przez kanały jonowe jest przynajmniej tysiąc razy szybszy niż przez jakikolwiek znany przenośnik.
- Większość kanałów jonowych jest bramkowana i otwiera się na krótko w odpowiedzi na specyficzny bodziec, taki jak zmiana wartości potencjału błonowego (kanały bramkowane potencjałem) lub wiązanie liganda (kanały bramkowane ligandem).
- Kanały jonowe nawet po otwarciu przez specyficzny dla nich bodziec nie pozostają otwarte przez dłuższy czas: oscylują one w sposób przypadkowy między konformacją otwartą i zamkniętą. Bodziec aktywujący zwiększa proporcję czasu, w którym kanał pozostaje w stanie otwartym.
- Wartość potencjału błonowego jest zdeterminowana przez nierównomierne rozmieszczenie ładunku elektrycznego po obu stronach błony komórkowej i zmienia się, gdy jony przepływają przez otwarte kanały. W większości komórek zwierząt selektywne wobec K^+ kanały spoczynkowe utrzymują ujemny spoczynkowy potencjał błonowy przy wartości ujemnej, zbliżony do wartości, przy której siła napędowa do przemieszczania K^+ w poprzek błony jest bliska zeru.
- Neurony przewodzą sygnały w formie potencjałów czynnościowych, które wędrują bez słabnięcia wzdłuż aksonu na dalekie odległości. Potencjały czynnościowe są zazwyczaj wynikiem działania bramkowanych napięciem kanałów Na^+, które otwierają się w odpowiedzi na depolaryzację błony komórkowej.
- Bramkowane napięciem kanały Ca^{2+} w zakończeniach nerwowych sprzęgają sygnały elektryczne z *uwolnieniem przekaźników nerwowych* w synapsie. Kanały jonowe bramkowane przekaźnikami nerwowymi zamieniają w postsynaptycznej komórce docelowej te chemiczne sygnały z powrotem w sygnały elektryczne.
- Pobudzające przekaźniki nerwowe otwierają bramkowane przekaźnikiem kanały przepuszczalne dla Na^+ i przez to powodują depolaryzację postsynaptycznej błony komórkowej postępującą w kierunku potencjału progowego dla powstania potencjału czynnościowego. Hamujące przekaźniki nerwowe otwierają bramkowane przekaźnikiem kanały Cl^- i utrzymując wysoką wartość potencjału błonowego komórki postsynaptycznej utrudniają wytworzenie potencjału czynnościowego.

Hasła

akson
białko kanału
błonowe białka transportujące
ciśnienie osmotyczne
gradient elektrochemiczny
kanał aktywowany przez stres
kanał bramkowany ligandem
kanał bramkowany napięciem
kanał bramkowany przekaźnikiem nerwowym
kanał jonowy
kanał Na^+ bramkowany napięciem
neuron
osmoza
patch-clamp (technika zapisu)
pęcherzyk synaptyczny
pompa Na^+-K^+
potencjał błonowy
potencjał czynnościowy
przekaźnik nerwowy
przenośnik
przenośnik sprzężony
równanie Nernsta
transport aktywny
transport bierny
zakończenie nerwu

Pytania

Pytanie 12-9. Które z następujących twierdzeń są prawdziwe? Wyjaśnij swoje odpowiedzi.

A. Błona komórkowa jest w znacznym stopniu nieprzepuszczalna dla wszystkich naładowanych cząsteczek.

B. Białka kanałów muszą związać cząsteczki rozpuszczalne w wodzie lub jon, zanim mogą dokonać selekcji tych substancji, które przepuszczają.

C. Komórki będą pękać, jeżeli nie będą miały stałego dopływu energii.

D. Przenośniki umożliwiają znacznie szybszy przepływ substancji przez błonę, niż mogą to zapewnić kanały.

E. Pewne pompy H^+ są zasilane energią świetlną.

F. Błona komórkowa wielu komórek zwierząt zawiera otwarte kanały K^+, a jednak stężenie K^+ w cytozolu jest znacznie większe niż na zewnątrz komórki.

G. Symport działałby jak antyport, gdyby jego orientacja w błonie została odwrócona (tj. gdyby część cząsteczki przenośnika normalnie wystawiona do cytozolu została wyeksponowana na zewnątrz komórki).

H. Potencjał błonowy aksonu pobudzony przez potencjał czynnościowy przyjmuje przejściowo wartość bardziej ujemną.

Pytanie 12-10. Wymień przynajmniej jedno podobieństwo i jedną różnicę istniejącą między następującymi pojęciami: (Może w tym pomóc przejrzenie definicji terminów zawartych w Słowniczku).

A. Symport i antyport

B. Transport aktywny i bierny

C. Potencjał błonowy i gradient elektrochemiczny

D. Pompy i przenośniki

E. Akson i przewód telefoniczny

F. Substancja rozpuszczona w wodzie i jon

Pytanie 12-11. Przedyskutuj następujące twierdzenie: „Różnice między kanałem i przenośnikiem przypominają różnice między mostem a promem."

Pytanie 12-12. Przekaźnik nerwowy, acetylocholina, jest wytwarzany w cytozolu i następnie wprowadzany do pęcherzyków synaptycznych, gdzie jego stężenie jest ponad 100 razy większe niż w cytozolu. Pęcherzyki synaptyczne wyizolowane z neuronów mogą pobrać dodatkową ilość acetylocholiny dodanej do otaczającego je roztworu, ale tylko wtedy, gdy obecny jest ATP. Do pobrania acetylocholiny nie są potrzebne jony Na^+, ale — co może być zaskakujące — zwiększenie pH takiego roztworu przyspiesza pobieranie acetylocholiny do znajdujących się w tym roztworze pęcherzyków synaptycznych. Co więcej, transport ten zostanie zahamowany po dodaniu specyficznych substancji (np. antybiotyków), które uczynią błonę przepuszczalną dla jonów H^+. Zaproponuj mechanizm zgodny z tymi wszystkimi obserwacjami.

Pytanie 12-13. Spoczynkowy potencjał błonowy komórki wynosi ok. –70 mV, a grubość dwuwarstwy lipidowej — ok. 4,5 nm. Jaka jest siła pola elektrycznego działającego w poprzek błony, wyrażona w V/cm? Jak myślisz, co nastąpiłoby, gdybyś przyłożył takie napięcie do dwóch elektrod metalowych oddalonych od siebie o 1 cm przestrzeni powietrznej?

Pytanie 12-14. Dwuwarstwy fosfolipidowe tworzą w wodzie zasklepione, kuliste pęcherzyki (patrz rozdz. 11). Załóżmy, że skonstruowałeś pęcherzyki lipidowe zawierające jako jedyne białko błonowe pompy Na^+-K^+; załóżmy też dla uproszczenia, że każda pompa w swym cyklu pracy transportuje jeden Na^+ w jednym kierunku oraz jeden K^+ w drugim kierunku. Domeny wszystkich cząsteczek pomp Na^+-K^+, które normalnie są eksponowane do cytozolu, obecnie są eksponowane na zewnątrz pęcherzyków. Korzystając z rys. 12-11 określ, co by się stało, gdyby...

A. Twoje pęcherzyki znalazły się w roztworze zawierającym jony zarówno Na^+, jak i K^+ i zawierały w swym wnętrzu roztwór o tym samym składzie jonowym.

B. Dodałbyś ATP do zawiesiny opisanej w A.

C. Dodałbyś ATP, ale oba płyny, zarówno ten na zewnątrz, jak i w środku pęcherzyków, zawierałyby tylko jony Na^+ (bez jonów K^+).

D. Połowa cząsteczek pomp umieszczonych w błonie każdego pęcherzyka była zorientowana w przeciwną stronę, to znaczy, że te domeny cząsteczek, które normalnie są zorientowane ku cytozolowi, byłyby eksponowane do wnętrza pęcherzyków. Następnie podałbyś ATP do zawiesiny.

E. Gdybyś dodał ATP do zawiesiny, opisanej w A, ale gdyby błony twoich pęcherzyków poza pompami Na^+-K^+ miały również spoczynkowe kanały K^+.

Pytanie 12-15. Podaj trzy sposoby, którymi kanał jonowy może być bramkowany.

Pytanie 12-16. Jeden tysiąc kanałów Ca^{2+} otwiera się w błonie komórkowej komórki, która ma 1000 μm^3 objętości i w której cytozolu stężenie Ca^{2+} jest 100 nM. Jak długo kanały musiałyby pozostać otwarte, aby cytozolowe stężenie Ca^{2+} wzrosło do 5 μM? W środowisku zewnętrznym dostępność Ca^{2+} jest w zasadzie nieograniczona (w płynie zewnątrzkomórkowym, w którym żyje większość komórek zwierzęcych, stężenie Ca^{2+} ma wartość kilku milimoli/dcm^3), a każdy kanał umożliwia przejście 10^6 jonów Ca^{2+} na sekundę.

Pytanie 12-17. Aminokwasy są pobierane przez komórki zwierząt z użyciem symportu w błonie komórkowej. Jaki to jon najprawdopodobniej umożliwi swym elektrochemicznym gradientem zasilanie importu? Czy w tym procesie jest zużywany ATP, a jeśli tak, to w jaki sposób?

Pytanie 12-18. W rozdz. 14 zobaczymy, że kwaśne pH wewnątrz endosomów, błonowych organelli komórkowych, jest niezbędne do ich funkcjonowania. Zakwaszenie to jest umożliwiane działaniem pompy H^+ w błonie endosomów. Błona ta zawiera również kanał Cl^-. Jeśli kanały nie funkcjonują właściwie (np. z powodu mutacji genów kodujących białka kanałów), zakwaszanie jest także upośledzone.

A. Czy możesz wyjaśnić, w jaki sposób kanały Cl^- mogą pomagać w zakwaszaniu?

B. Czy według twojego wyjaśnienia kanały Cl^- byłyby koniecznie potrzebne do zmniejszania pH wewnątrz endosomu?

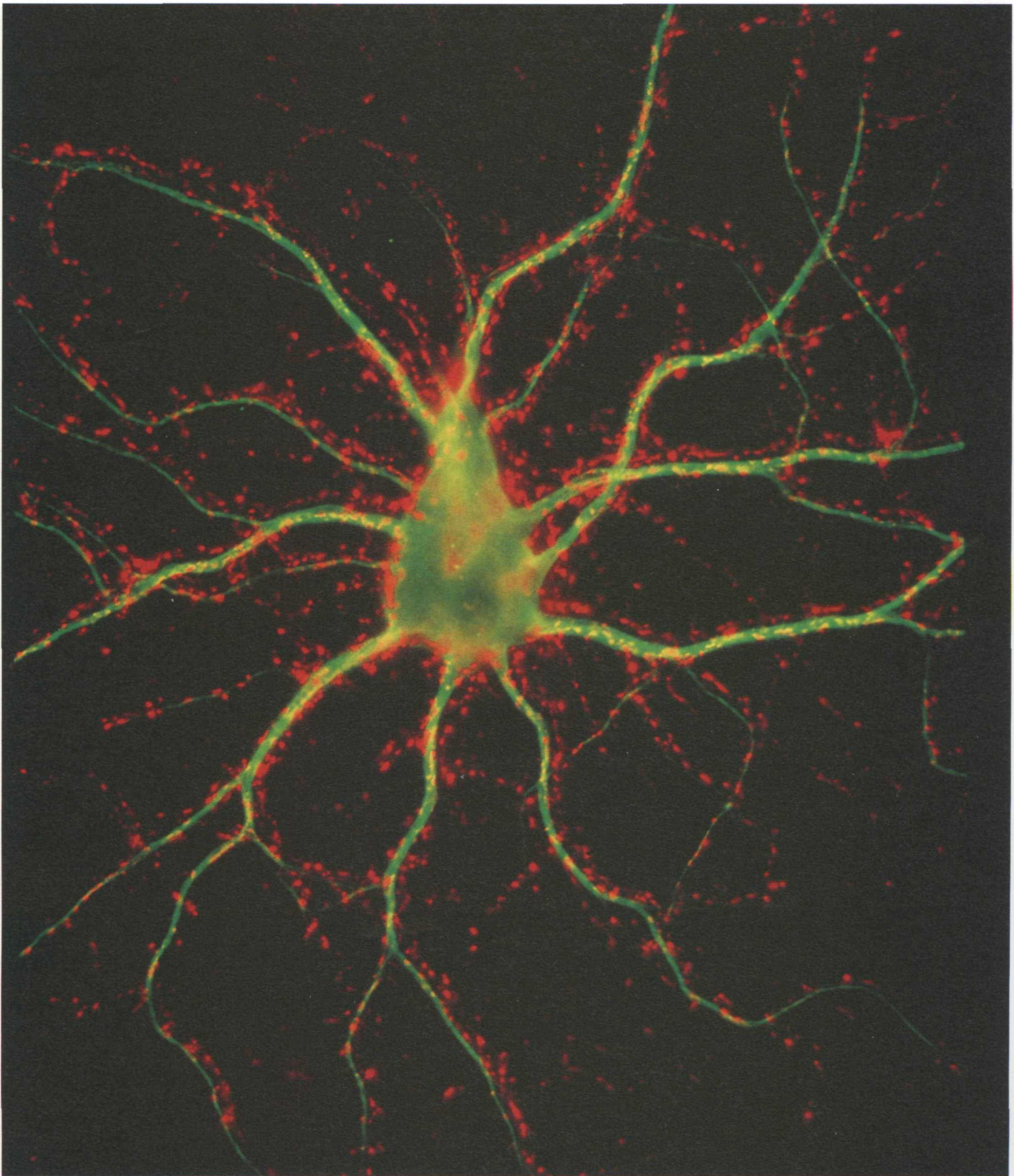
Pytanie 12-19. Pewne bakterie mogą rosnąć albo na etanolu (CH_3CH_2OH), albo octanie (CH_3COO^-) jako ich jedynym źródle węgla. Dr Schwips zmierzył szybkość, z jaką te dwa składniki przenikają przez błonę komórkową bakterii, ale z powodu nadmiernej inhalacji jednego ze składników (którego?) nie zdołał dokładnie zapisać swych wyników.

A. Sporządź wykres na podstawie danych zawartych w poniższej tabelce.

B. Określ ze swego wykresu, czy dane opisujące związek A odpowiadają pobieraniu etanolu, czy octanu.

C. Wyznacz szybkość transportu związków A i B w ich stężeniu 0,5 mM i 100 mM. (Ta część pytania wymaga znajomości zasad kinetyki enzymatycznej, omówionych w rozdz. 5). Wyjaśnij swoje odpowiedzi.

Stężenie źródła węgla (mM)	Szybkość transportu (μmol/min)	
	związek A	**związek B**
0,1	2,0	18
0,3	6,0	46
1,0	20	100
3,0	60	150
10,0	200	182



Komórka nerwowa szczura w hodowli tkankowej. Jej perykarion i dendryty (kolor *zielony*) wybarwiono fluorescencyjnym przeciwciałem rozpoznającym białka cytoszkieletu. Tysiące zakończeń aksonów (kolor *czerwony*) dochodzących z innych, niewidocznych komórek nerwowych wytwarzają synapsy na powierzchni komórki; są one wybarwione fluorescencyjnym przeciwciałem rozpoznającym białko pęcherzyków synaptycznych. Sygnały elektryczne są wysyłane wzdłuż aksonów, przekazywane przez synapsy i przechodzą wzdłuż dendrytów w kierunku perykarionu. Przesyłanie sygnału polega na przechodzeniu jonów przez błonę komórkową komórek nerwowych. (Dzięki uprzejmości: Olaf Mundigl, Pietro de Camilli)

13 Przekształcanie energii w mitochondriach i chloroplastach

- Komórki większość energii uzyskują dzięki mechanizmowi, którego podstawą działania jest błona

MITOCHONDRIA I FOSFORYLACJA OKSYDACYJNA

- Mitochondria zawierają dwa przedziały zamknięte błonami
- Elektrony o wysokiej energii pochodzą z cyklu kwasu cytrynowego
- W wewnętrznej błonie mitochondrialnej elektrony są przenoszone wzdłuż szeregu białek
- Transport elektronów powoduje powstanie gradientu protonowego w poprzek błony
- Gradient protonowy napędza syntezę ATP
- Sprzężony transport w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej jest napędzany przez elektrochemiczny gradient protonowy
- Gradienty protonowe wytwarzają większość komórkowego ATP
- Szybkie fosforylowanie ADP do ATP w mitochondriach utrzymuje dużą wartość stosunku ATP : ADP w komórkach

ŁAŃCUCH TRANSPORTU ELEKTRONÓW A POMPOWANIE PROTONÓW

- Protony są z łatwością przemieszczane dzięki transportowi elektronów
- Potencjał redoks jest miarą powinowactwa do elektronów
- Transport elektronów uwalnia dużą ilość energii
- Metale ściśle związane z białkami stanowią uniwersalne przenośniki elektronów
- Protony są pompowane w poprzek błony przez trzy kompleksy enzymów oddechowych
- Oddychanie jest zdumiewająco skuteczne

CHLOROPLASTY I FOTOSYNTEZA

- Chloroplasty przypominają mitochondria, lecz mają dodatkowy przedział
- Chloroplasty zbierają energię promieniowania słonecznego i wykorzystują ją do wiązania węgla
- Cząsteczki wzbudzonego chlorofilu skierowują energię do centrum reakcji
- Synteza ATP i NADPH wymaga energii świetlnej
- Wiązanie węgla jest katalizowane przez karboksylazę rybulozobisfosforanową
- Wiązanie węgla w chloroplastach wytwarza sacharozę i skrobię
- Systemy genetyczne mitochondriów i chloroplastów są ilustracją ich prokariotycznego pochodzenia

NASI JEDNOKOMÓRKOWI ANTENACI

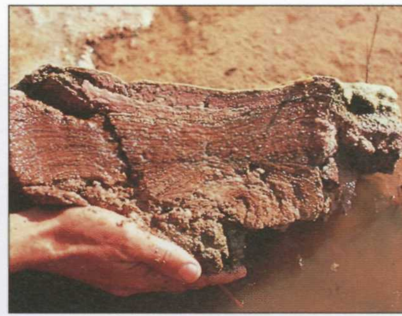
- Sekwencje RNA odsłaniają historię ewolucji
- Przodkowie komórek prawdopodobnie pojawili się w gorących środowiskach
- *Methanococcus* żyje w ciemności, używając jako pożywienia tylko związków nieorganicznych

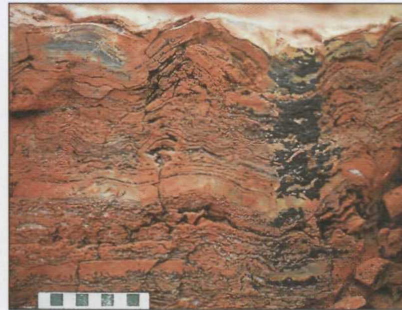
Na podstawie śladów geologicznych można wnioskować, że w czasie powstawania życia na Ziemi w atmosferze nie było tlenu. W tych warunkach jedynym możliwym sposobem wzrostu i przeżycia komórek musiało być rozszczepianie cząsteczek organicznych — powstałych we wcześniejszych procesach geochemicznych — przez jakąś formę beztlenowej fermentacji. Jak już omówiono w rozdz. 4, reakcje fermentacji zachodzą w cytozolu współczesnych komórek; energię, uzyskiwaną podczas częściowego utleniania bogatych w energię cząsteczek pokarmowych, wykorzystują one do tworzenia ATP — tej formy energii chemicznej, z której powszechnie korzystają komórki. Jednak już w bardzo wczesnej historii życia pojawiła się znacznie skuteczniejsza metoda generowania energii i syntezy ATP. Proces ten jest oparty na transporcie elektronów w błonach przekształcających energię. To właśnie głównie dzięki niemu życie na Ziemi przetrwało następne miliardy lat i dlatego ten rozdział w całości poświęcamy temu procesowi. Jak zobaczymy, mechanizm, którego podstawę stanowią błony, komórki wykorzystują do zdobywania energii z bardzo różnych źródeł: na przykład, jest to główny mechanizm przekształcania energii świetlnej w energię wiązań chemicznych w fotosyntezie, a także oddychania tlenowego, które umożliwia nam wykorzystanie tlenu do wytwarzania dużych ilości ATP z cząsteczek pożywienia.

Pojawienie się takiego mechanizmu przekształcania energii wywarło głęboki wpływ na historię życia na Ziemi. Ziemia ma 4,6 miliarda lat. Skamieniałości powstałe 3,5 miliarda lat temu sugerują, że w tym czasie były już obecne bakterie fotosyntetyzujące wytwarzające tlen (rys. 13-1). Potomkowie tych komórek, tłocząc się w każdym kącie i szczelinie lądu oraz oceanów razem z pierwotną menażerią żywych form, napełniali atmosferę tlenem gazowym (O_2).

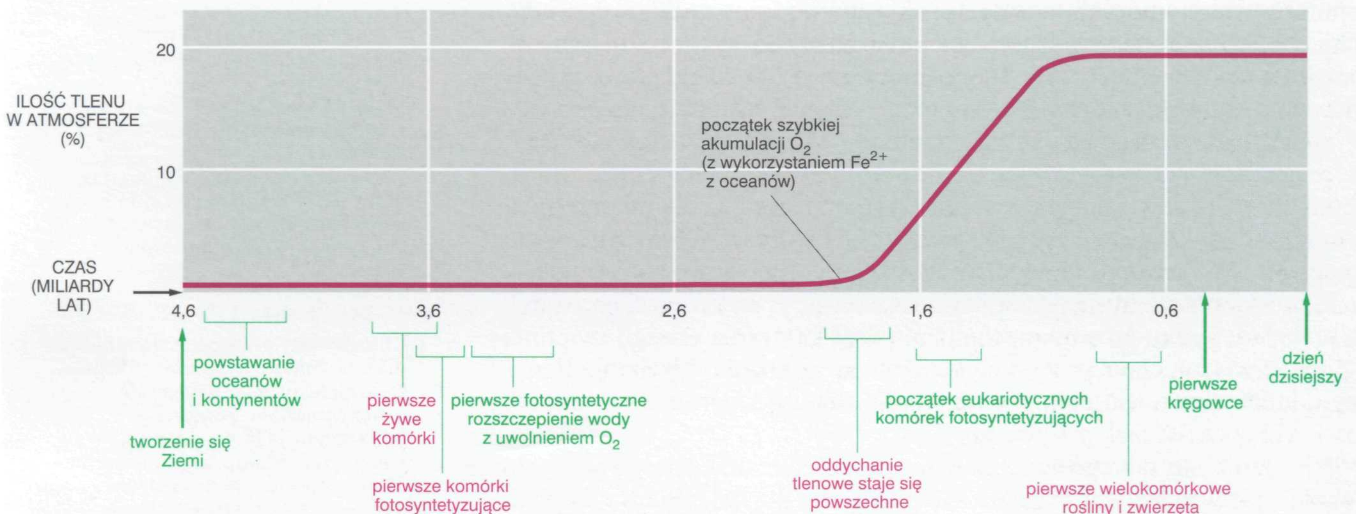
Skąd przyszliśmy i jakie są nasze wzajemne powiązania z innymi żywymi organizmami, to pytania, które fascynują ludzi od zarania historii. Kolejne etapy powstawania życia na Ziemi przedstawiono w krótkim zarysie, na podstawie aktualnego stanu wiedzy, na rys. 13-2. Ta opowieść, dzieło stworzone przez długi ciąg badań naukowych, jest jedną z najbardziej dramatycznych i ekscytujących historii, jakie kiedykolwiek przedstawiono. Ale to jeszcze nie wszystko. Dzięki technikom molekularnym, otwierającym coraz to nowe możliwości, dalsze odkrycia w biologii molekularnej umożliwiają nam dołączenie z każdym rokiem większej ilości szczegółów.


(A)


(B)


(C)

Rys. 13-1. Mikroorganizmy przeprowadzające fotosyntetyczne uwalnianie tlenu zmieniły atmosferę ziemską. (A) Żywe stromatolity z laguny w zachodniej Australii. Te struktury formowane w wyspecjalizowanych środowiskach przez duże kolonie cyjanobakterii uwalniających tlen fotosyntetycznie, są zbudowane z kolejno osadzanych przez te kolonie warstw materiału. (B) Przekrój poprzeczny przez współczesny stromatolit, ukazujący jego warstwową strukturę. (C) Przekrój poprzeczny przez kopalny stromatolit ze skały mającej 3,5 miliarda lat. Zwróćmy uwagę na strukturę warstwową, podobną do pokazanej na rysunku (B). Kopalne stromatolity prawdopodobnie zostały utworzone przez bakterie fotosyntetyzujące, bardzo podobne do współczesnych cyjanobakterii. Działalność podobnych bakterii uwalniających O_2 gazowy, jako produkt uboczny fotosyntezy, mogła więc powoli zmieniać atmosferę ziemską. (A — dzięki uprzejmości: Sally Birch. © Oxford Scientific Films. B, C — dzięki uprzejmości: S. M. Awramik, University of California/Biological Photo Service)



Rys. 13-2. Pewne ważne wydarzenia które, jak się przypuszcza, zaszły na Ziemi w toku ewolucji żywych organizmów. Po rozwinięciu się w drodze ewolucji procesów opartych na błonach fotosyntetyzujących, organizmy nie były już dłużej uzależnione od gotowych związków organicznych. Mogły teraz syntetyzować swoje własne cząsteczki organiczne z gazowego CO_2. Opóźnienie dłuższe niż miliard lat pomiędzy pojawieniem się bakterii, które rozszczepiały wodę i uwalniały O_2 podczas fotosyntezy, a akumulacją dużego stężenia tlenu w atmosferze, prawdopodobnie było spowodowane tym, że początkowo tlen reagował z bogatymi zasobami żelaza, rozpuszczonego w formie żelazawej (Fe^{2+}) we wczesnych oceanach. To żelazo mogło było usuwać tlen z atmosfery i tworzyć olbrzymie złoża tlenku żelaza, znalezione w niektórych skałach z tego okresu. Dopiero po zużyciu żelaza tlen mógł zacząć się gromadzić w atmosferze. Oddychanie tlenowe związane z błonami przypuszczalnie pojawiło się w odpowiedzi na podwyższenie poziomu tlenu w atmosferze. Gdy powstały organizmy nie fotosyntetyzujące, a tylko zużywające tlen, stężenie tlenu w atmosferze ustaliło się

Oczywiście do stopniowego rozwoju życia najważniejsze było zapewnienie komórkom obfitych źródeł energii. Obecnie omówimy godny podziwu mechanizm, który sprawia, że to wszystko jest możliwe.

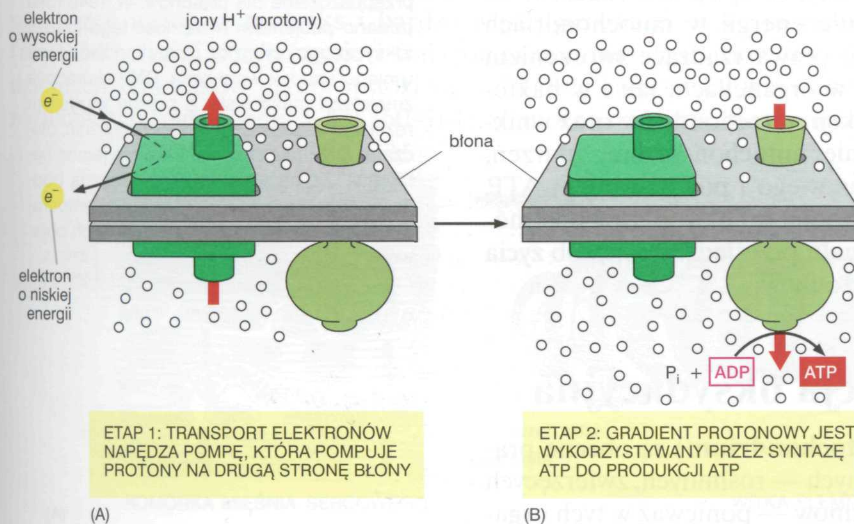
Komórki większość energii uzyskują dzięki mechanizmowi, którego podstawą działania jest błona

Głównym przenośnikiem energii chemicznej w komórce jest ATP. W komórkach eukariotycznych małe ilości ATP powstają w cytozolu podczas glikolizy (omówionej w rozdz. 4), ale większość ATP jest wytwarzana w mitochondriach (jak również w chloroplastach roślin i sinic), a podstawę tego działania stanowią procesy błonowe. Bardzo podobne procesy występują w błonach komórkowych wielu bakterii. Podstawowy mechanizm wykorzystywany do produkcji ATP we wszystkich wymienionych przypadkach pojawił się bardzo wcześnie w historii życia i był to taki sukces, że jego najważniejsze właściwości zachowały się mimo długiej drogi przez ewolucję, a więc od wczesnych prokariotów do współczesnych komórek. Proces ten składa się z dwóch wzajemnie powiązanych etapów; oba z nich są realizowane przez kompleksy białkowe zakotwiczone w błonie.

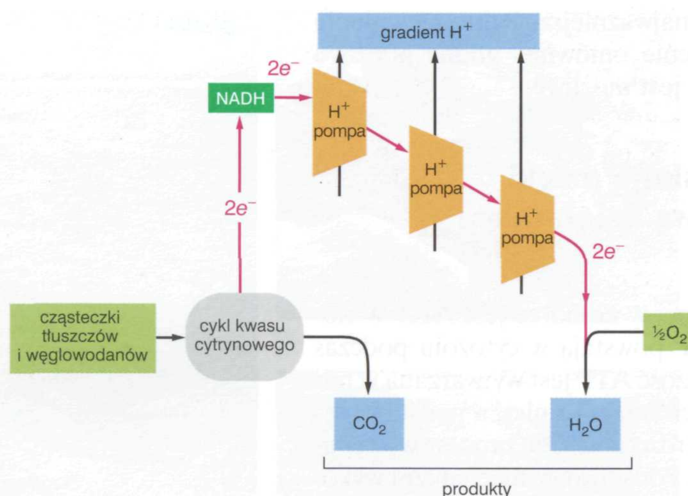
Etap 1. Elektrony (uzyskane z utleniania cząsteczek pokarmowych lub innych źródeł, które omówimy później) są transportowane wzdłuż szeregu umieszczonych w błonie przenośników elektronów — nazwanego *łańcuchem transportu elektronów*. Podczas przenoszenia elektronów zostaje uwalniana energia wykorzystywana do pompowania w poprzek błony protonów (H^+, pochodzących z wody, która jest wszędzie obecna w komórkach); w ten sposób powstaje elektrochemiczny gradient protonowy. Jak omówiono w rozdz. 12, gradient jonowy wytworzony w poprzek błony jest formą magazynowania energii; energia ta może być wykorzystana do pracy użytecznej wówczas, gdy jony mają możliwość przepływania z powrotem przez błonę, zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym.

Etap 2. H^+ przepływają z powrotem zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym przez kompleks białkowy nazwany *syntazą* ATP, który katalizuje wymagającą energii syntezę ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego (P_i). Ten wszechobecny enzym spełnia rolę turbiny, która umożliwia gradientowi protonowemu napędzanie produkcji ATP (rys. 13-3).

Zaproponowaną po raz pierwszy w latach sześćdziesiątych hipotezę zakładającą związek między transportem elektronów, pompowaniem proto-



Rys. 13-3. Wykorzystanie energii do życia. (A) Podstawowym warunkiem chemiosmozy są błony, w których znajdują się białka pompujące i syntaza ATP oraz źródło elektronów o wysokiej energii (e^-) i protonów (H^+). Pompy używają energię uwalnianą podczas transportu elektronów (szczegółów tutaj nie pokazano) do pompowania protonów uzyskiwanych z wody, tworząc gradient protonowy w poprzek błony. (B) Gradient ten służy jako magazyn energii, która może być wykorzystana do napędzania syntezy ATP przez syntazę ATP. *Czerwone strzałki* pokazują kierunek ruchu protonów na każdym etapie



Rys. 13-4. Pompowanie protonów w mitochondriach. Pokazano tylko etap 1 sprzężenia chemiosmotycznego. Źródła energii zaznaczono kolorem *jasnozielonym*, produkty — *niebieskim*, a drogę przepływu elektronów wskazują *strzałki czerwone*

nów i syntezą ATP nazwano *hipotezą chemiosmotyczną*, ze względu na współdziałanie reakcji tworzących wiązania chemiczne podczas syntezy ATP („chemi") z procesami transportu przez błony („osmotyczna", od słowa greckiego *osmos*, tzn. „pchać"). Obecnie ten mechanizm nazywamy **sprzężeniem chemiosmotycznym**.

Z podstawowego mechanizmu chemiosmotycznego, zaznaczonego schematycznie na rys. 13-3, korzysta ogromna większość żywych organizmów, a jako źródło elektronów zasilających pompowanie protonów może służyć duża ilość różnych substancji. Na przykład sprzężenie chemiosmotyczne stanowi podstawę oddychania tlenowego, podczas którego mitochondria i bakterie tlenowe wytwarzają ATP; w tym przypadku elektrony ostatecznie pochodzą z utleniania glukozy czy kwasów tłuszczowych (omówionego w rozdz. 4), a tlen cząsteczkowy działa jako końcowy akceptor elektronów, wytwarzający wodę jako produkt uboczny (rys. 13-4). W procesie fotosyntezy elektrony potrzebne do sprzężenia chemiosmotycznego są dostarczane wtedy, kiedy światło oddziałuje na zielony barwnik, chlorofil. Natomiast niektóre bakterie do syntezy ATP jako źródła elektronów o wysokiej energii używają substancji nieorganicznych, takich jak wodór, żelazo i siarka.

Sprzężenie chemiosmotyczne najpierw rozwinęło się u bakterii. Nie powinno więc dziwić, że komórki eukariotyczne — jak sądzimy — zaadaptowały cały chemiosmotyczny mechanizm bakterii; najpierw wchłonęły bakterie tlenowe i tak powstały mitochondria, a nieco później — gdy pojawiły się w drzewie rodowym sinice i rośliny — dzięki wchłonięciu przez nie cyjanobakterii powstały chloroplasty, co opisano w rozdz. 1.

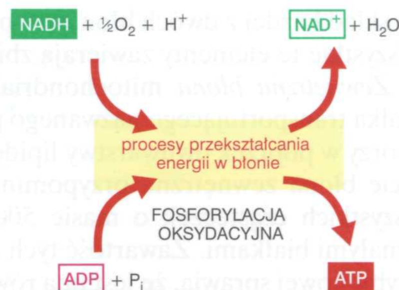
W tym rozdziale omówimy powstawanie energii w mitochondriach i chloroplastach, kładąc nacisk na ogólne prawa rządzące tworzeniem i wykorzystywaniem gradientów zarówno w organellach, jak i w bakteriach. Zaczniemy od opisu struktury i funkcji mitochondriów oraz wnikniemy w szczegóły zachodzących w błonie mitochondrialnej zdarzeń, związanych z tworzeniem gradientu protonowego i powstawaniem ATP. Następnie omówimy fotosyntezę umiejscowioną w chloroplastach komórek roślinnych. Wreszcie pod koniec rozdziału prześledzimy sposób życia niektórych naszych jednokomórkowych przodków.

Pytanie 13-1. Dinitrofenol (DNP) jest małą cząsteczką, która sprawia, że błony stają się przepuszczalne dla protonów. W 1940 roku podano pacjentowi małą ilość tego bardzo toksycznego związku, żeby spowodować u niego spadek wagi ciała. DNP skutecznie zmniejszył masę ciała, a przede wszystkim rezerwy tłuszczu. Czy możesz wyjaśnić, dlaczego DNP tak zadziałał? Nieprzyjemną natomiast dla pacjenta reakcją uboczną podczas leczenia było podwyższenie temperatury i obfite poty. Podaj przyczynę tych objawów.

Mitochondria i fosforylacja oksydacyjna

Mitochondria (w liczbie pojedynczej **mitochondrium**) są obecne prawie we wszystkich komórkach eukariotycznych — roślinnych, zwierzęcych i większości eukariotycznych mikroorganizmów — ponieważ w tych orga-

nellach powstaje większość komórkowego ATP. Jak omówiono w rozdz. 4, mitochondria metabolizują grupy acetylowe w cyklu kwasu cytrynowego, przy czym tworzy się CO_2 jako produkt uboczny i NADH — zaktywowana cząsteczka nośnika energii, która przenosi elektrony o wysokiej energii. NADH oddaje te elektrony na łańcuch transportu elektronów umiejscowiony w błonie mitochondrialnej i w ten sposób sam zostaje utleniony do NAD^+. Elektrony zostają szybko przeniesione wzdłuż łańcucha do tlenu cząsteczkowego (O_2), przy czym tworzy się woda (H_2O). Energia uwolniona podczas przejścia elektronów wzdłuż łańcucha transportu elektronów zostaje wykorzystana do pompowania protonów (patrz rys. 13-4), a gradient protonowy z kolei napędza syntezę ATP, co kończy działanie mechanizmu chemiosmotycznego. Proces, w którym zostaje zużyty O_2 i zachodzi synteza ATP (poprzez dodanie grupy fosforanowej do ADP), nazwano **fosforylacją oksydacyjną** (rys. 13-5).



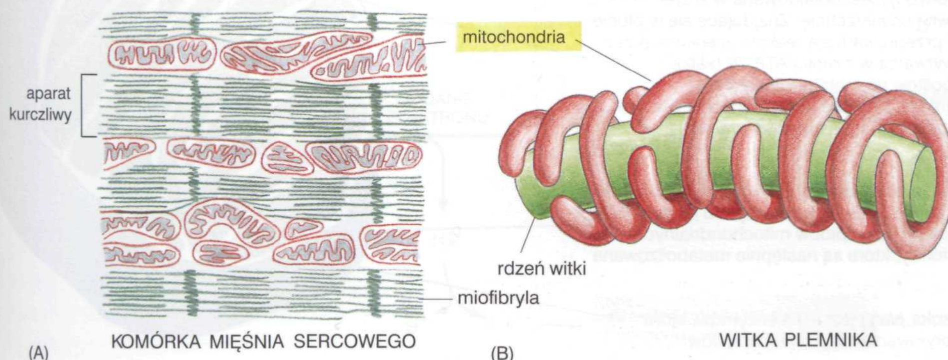
Rys. 13-5. Zasadnicze przekształcenie energii zachodzące w mitochondrium. Energia uwalniana przez utlenianie NADH do NAD^+ jest używana w fosforylacji oksydacyjnej — poprzez procesy przekształcające energię w błonie (transport elektronów, pompowanie protonów i przepływ protonów poprzez syntazę ATP) — do wymagającej energii fosforylacji ADP w celu utworzenia ATP. Usunięte z NADH elektrony o wysokiej energii przechodzą wzdłuż łańcucha transportu elektronów w błonie i w końcu łączą się z cząsteczką tlenu i H^+, aby utworzyć wodę. Gdy dwa elektrony przechodzą od NADH do tlenu (patrz rys. 13-4), równanie netto dla tego procesu transportu elektronów jest następujące: NADH + $+ \frac{1}{2}O_2 + H^+ \rightarrow NAD^+ + H_2O$

Takie same zdarzenia występują w bakteriach tlenowych nie mających mitochondriów; tutaj procesy chemiosmotyczne przebiegają w błonie plazmatycznej. Jednakże w odróżnieniu od bakterii, które zajmują się wieloma innymi funkcjami, mitochondria, jak zobaczymy później, znakomicie wyspecjalizowały się w wytwarzaniu energii.

Mitochondria zawierają dwa przedziały zamknięte błonami

Mitochondria są zazwyczaj pod względem kształtu i wymiaru podobne do bakterii, aczkolwiek ich właściwości mogą się różnić w zależności od typu komórki. Zawierają własne DNA i RNA oraz kompletny system transkrypcji i translacji z rybosomami włącznie, który pozwala im na syntetyzowanie części swoich białek. Gdy przyglądamy im się dłużej, odkrywamy, że mitochondria są niezwykle ruchliwymi organellami, stale zmieniają kształt i położenie. Występują w dużej ilości i mogą tworzyć długie, ruchome łańcuchy związane z mikrotubulami cytoszkieletu (patrz rozdz. 16). W niektórych komórkach pozostają one nieruchome, rozmieszczone tak, aby mogły przekazywać ATP bezpośrednio do miejsca, w którym zużycie ATP jest wyjątkowo duże. Na przykład, w komórce mięśnia sercowego mitochondria przylegają do aparatu kurczliwego, natomiast w plemniku ciasno oplatają ruchomą witkę (rys. 13-6).

Każde mitochondrium jest ograniczone dwoma wysoce wyspecjalizowanymi błonami — jedna otacza drugą — które odgrywają decydującą rolę w jego aktywności. Obie błony mitochondrialne, zewnętrzna i wewnętrzna, tworzą dwa przedziały mitochondrialne: dużą wewnętrzną przestrzeń nazwaną **matriks** i bardzo wąską *przestrzeń międzybłonową* (rys. 13-7). Jeżeli oczyszczanie i frakcjonowanie mitochondriów do oddzielnych składników przeprowadzi się delikatnie za pomocą wirowania różnicowego (patrz panel 5-4 s. 160–161), to można oznaczyć biochemicz-



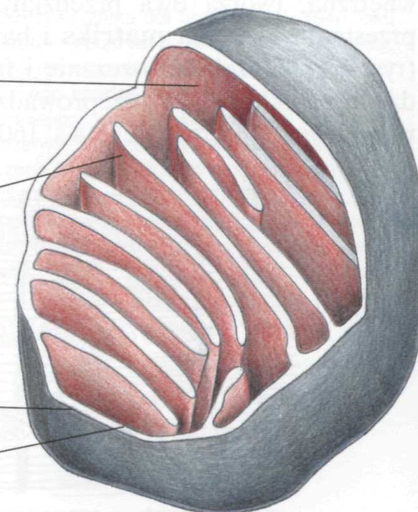
Rys. 13-6. Rozmieszczenie mitochondriów w miejscach o dużym zapotrzebowaniu na ATP. (A) W komórce mięśnia sercowego mitochondria są rozmieszczone bardzo blisko aparatu kurczliwego, w którym energii do skurczu dostarcza hydroliza ATP. (B) W plemnikach mitochondria są umieszczone we wstawce, gdzie oplatają one rdzeń ruchomej witki, której ruch wymaga ATP

ny skład każdej z dwóch błon oraz przestrzeni zamkniętej pomiędzy nimi. Wszystkie te elementy zawierają zbiór jedynych w swoim rodzaju białek.

Zewnętrzna błona mitochondrialna mieści w sobie wiele cząsteczek białka transportującego nazwanego poryną, które, jak opisano w rozdz. 11, tworzy w poprzek dwuwarstwy lipidowej szerokie kanały wodne. W rezultacie błona zewnętrzna przypomina sito, które jest przepuszczalne dla wszystkich cząsteczek o masie 5000 daltonów lub mniejszej, włącznie z małymi białkami. Zawartość tych małych cząsteczek w przestrzeni międzybłonowej sprawia, że jest ona równoważna pod względem chemicznym z cytozolem. Natomiast *błona wewnętrzna*, podobnie jak inne błony w ko-



Rys. 13-7. Ogólna organizacja mitochondrium. Każdy z czterech obszarów w mitochondriach zawiera unikatowy zestaw białek, które umożliwiają poszczególnym przedziałom spełnianie ich odrębnych funkcji. Obliczono, że w mitochondriach wątroby 67% całkowitego białka mitochondrialnego znajduje się w matriks, 21% jest zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, 6% w zewnętrznej błonie, a 6% w przestrzeni międzybłonowej (Dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)



Matriks. Ta duża przestrzeń wewnętrzna zawiera silnie zagęszczoną mieszaninę setek enzymów, łącznie z tymi, które biorą udział w utlenianiu pirogronianu i kwasów tłuszczowych oraz cyklu kwasu cytrynowego. Matriks zawiera również kilka identycznych kopii genomu mitochondrialnego DNA, specyficzne rybosomy mitochondrialne, tRNA i różne enzymy niezbędne do ekspresji genów mitochondrialnych.

Błona wewnętrzna. Błona wewnętrzna (kolor *czerwony*) jest pofałdowana w liczne grzebienie, które znacznie powiększają jej całkowitą powierzchnię. Znajdujące się w błonie wewnętrznej białka pełnią trzy rodzaje funkcji: 1) przeprowadzają reakcje utleniania przez łańcuch transportu elektronów, 2) syntaza ATP wytwarza w matriks ATP, 3) białka transportujące umożliwiają przechodzenie metabolitów do matriks i z matriks. Elektrochemiczny gradient H^+, który napędza syntazę ATP, jest utrzymywany w poprzek błony dzięki temu, że jest ona nieprzepuszczalna dla jonów i większości małych naładowanych cząsteczek.

Błona zewnętrzna. Przepuszcza wszystkie cząsteczki o masie do 5000 daltonów, ponieważ znajdują się w niej duże kanały utworzone przez białko (o nazwie poryna). Do innych białek zawartych w tej błonie należą enzymy prowadzące syntezę lipidów mitochondrialnych i enzymy zmieniające substraty lipidowe w takie formy, które są następnie metabolizowane w matriks.

Przestrzeń międzybłonowa. W tej przestrzeni (kolor *biały*) jest kilka enzymów, które wykorzystują wychodzący z matriks ATP do fosforylowania innych nukleotydów.

mórce, jest nieprzepuszczalna dla jonów i większości małych cząsteczek, z wyjątkiem tych, które są przenoszone przez błonowe białka transportujące. Dlatego więc matriks mitochondrialna zawiera tylko te cząsteczki, które mogą być selektywnie przetransportowane do niej przez błonę wewnętrzną i stąd jej zawartość jest wysoce wyspecjalizowana.

Wewnętrzna błona mitochondrialna jest miejscem transportu elektronów i pompowania protonów, a także lokalizacji syntazy ATP. Niezbędne do fosforylacji oksydacyjnej składniki łańcucha transportu elektronów stanowią większość białek osadzonych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Błona ta ma charakterystyczny skład lipidowy, a także zawiera rozmaite białka transportujące, które umożliwiają wejście do matriks wybranym małym cząsteczkom, takim jak kwas pirogronowy czy kwasy tłuszczowe.

Wewnętrzna błona jest zazwyczaj silnie rozbudowana i tworzy wiele wgłębiających się w matriks fałd nazwanych grzebieniami (*kristami*), co znacznie zwiększa jej powierzchnię (patrz rys. 13-7). Na tak uzyskanej dużej powierzchni zachodzi synteza ATP; na przykład w komórkach wątroby błony mitochondrialne wszystkich mitochondriów stanowią ok. jednej trzeciej całości błon komórkowych.

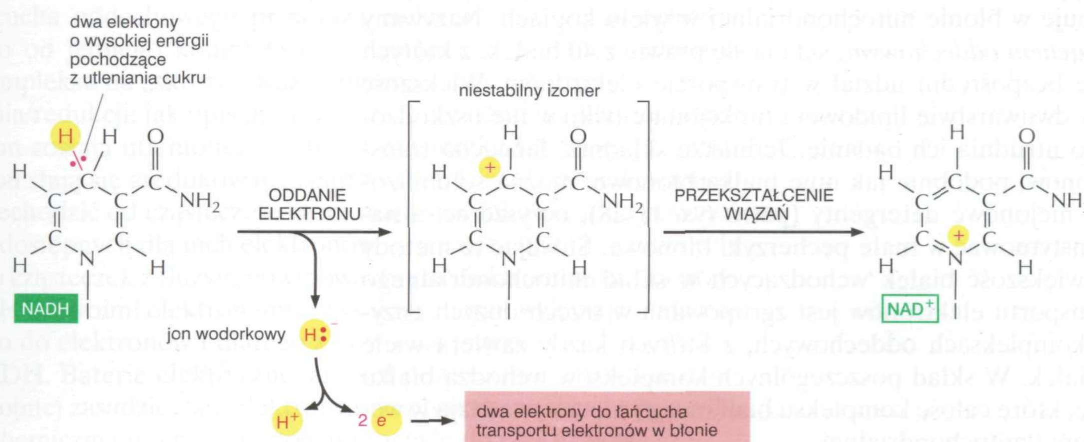
Pytanie 13-2. Mikrografie elektronowe pokazują, że w mitochondriach mięśnia sercowego grzebienie są znacznie gęstsze niż w mitochondriach komórek skóry. Zaproponuj wyjaśnienie tych obserwacji.

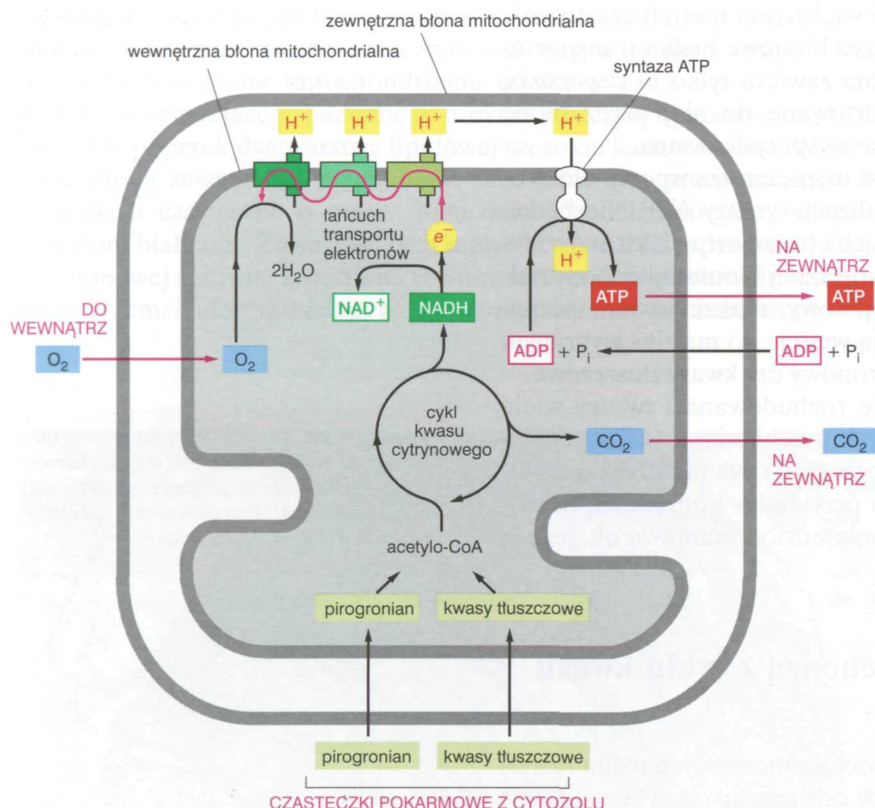
Elektrony o wysokiej energii pochodzą z cyklu kwasu cytrynowego

Mitochondria były niezbędne do ewolucji wielokomórkowych roślin i zwierząt. Bez nich dzisiejsze eukarioty musiałyby całą produkcję ATP uzależnić od stosunkowo niezbyt wydajnego procesu glikolizy (opisanego w rozdz. 4) i wydaje się mało prawdopodobne, aby złożone organizmy wielokomórkowe mogły przetrwać w ten sposób. Kiedy glukoza podczas glikolizy przekształca się w pirogronian, uwalnia się mniej niż 10% całości energii swobodnej, potencjalnie osiągalnej z utleniania glukozy. W mitochondriach metabolizm cukrowców jest doprowadzony do końca, a uwalniana energia zostaje wykorzystana tak wydajnie, że na każdą cząsteczkę utlenionej glukozy powstaje ok. 30 cząsteczek ATP. Natomiast w samej glikolizie tworzą się tylko dwie cząsteczki ATP w przeliczeniu na cząsteczkę glukozy.

Mitochondria mogą używać jako paliwa zarówno pirogronianu, jak i kwasów tłuszczowych. Pirogronian jest dostarczany z glukozy i innych cukrów, a kwasy tłuszczowe pochodzą z tłuszczów. Obie cząsteczki paliwowe są transportowane przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, a następnie przekształcane przez enzymy umiejscowione w matriks mitochondrialnej do kluczowego intermediatu metabolicznego, jakim jest *acetylo-CoA* (patrz s. 121). Grupy acetylowe acetylo-CoA są z kolei utleniane w matriks

Rys. 13-8. Jak NADH oddaje elektrony. Na rysunku elektrony o wysokiej energii pokazano jako dwie *czerwone kropki* na atomie wodoru zaznaczonym kolorem *żółtym*. Jon wodorkowy ($H:^-$, atom wodoru i dodatkowy elektron) jest usuwany z NADH i zostaje przekształcony do protonu i dwóch elektronów o wysokiej energii: $H:^- \rightarrow H^+ + 2e^-$. Pokazano jedynie pierścień przenoszący elektrony w wiązaniu „wysokoenergetycznym"; całkowitą strukturę i przejście NAD^+ z powrotem do NADH można poznać patrząc na strukturę analogicznego NADPH na rys. 3-28. Elektrony są również w podobny sposób przenoszone przez $FADH_2$, którego strukturę pokazano na rys. 4-12B



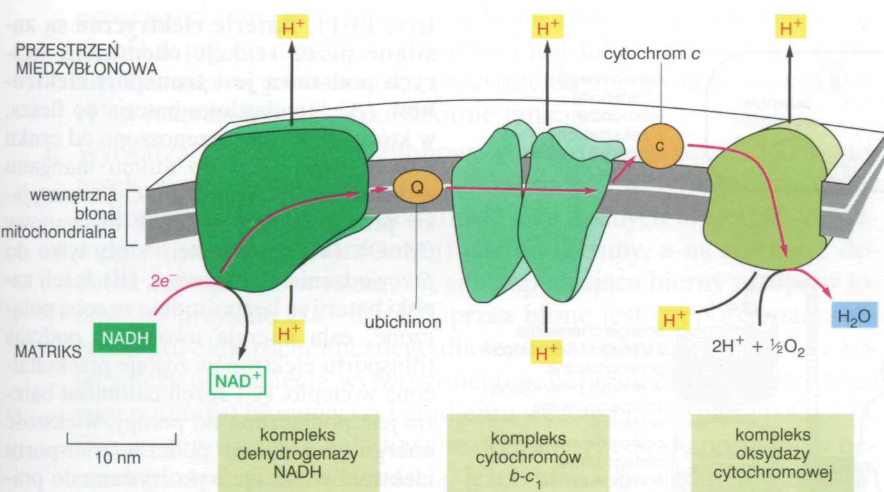


Rys. 13-9. Krótki przegląd metabolizmu generującego energię w mitochondriach. Pirogronian i kwasy tłuszczowe wchodzą do mitochondriów (*dół*), są rozkładane do acetylo-CoA, następnie metabolizowane w cyklu kwasu cytrynowego, który redukuje NAD^+ do NADH (i FAD^+ do $FADH_2$, nie pokazano). Z kolei w procesie fosforylacji oksydacyjnej elektrony o wysokiej energii z NADH (i $FADH_2$) są przenoszone w wewnętrznej błonie mitochondrialnej wzdłuż łańcucha oddechowego do tlenu (O_2). Ten transport elektronów generuje w poprzek wewnętrznej błony gradient protonowy, który syntaza ATP wykorzystuje do wytwarzania ATP

w cyklu kwasu cytrynowego. W cyklu wytwarza się CO_2, uwalniany z komórki jako produkt uboczny, oraz powstają elektrony o wysokiej energii przenoszone przez zaktywowane cząsteczki nośnikowe, NADH i $FADH_2$ (rys. 13-8). Te „wysokoenergetyczne" elektrony są z kolei przerzucane do wewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie wchodzą na łańcuch transportu elektronów; oddanie elektronów powoduje regenerację NAD^+ i FAD^+, cząsteczek niezbędnych do utrzymania ciągłości metabolizmu tlenowego. Następnie rozpoczyna się transport elektronów wzdłuż łańcucha. Kompletną sekwencję reakcji przedstawiono w ogólnym zarysie na rys. 13-9.

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej elektrony są przenoszone wzdłuż szeregu białek

Łańcuch transportu elektronów, który przeprowadza fosforylację oksydacyjną, występuje w błonie mitochondrialnej w wielu kopiach. Nazywany również *łańcuchem oddechowym*, składa się prawie z 40 białek, z których ok. 15 bierze bezpośredni udział w transporcie elektronów. Większość białek tkwi w dwuwarstwie lipidowej i funkcjonuje tylko w nie uszkodzonej błonie, co utrudnia ich badanie. Jednakże składniki łańcucha transportu elektronów, podobnie jak inne białka błonowe, można solubilizować stosując niejonowe detergenty (patrz rys. 11-28), oczyszczać, a następnie rekonstytuować w małe pęcherzyki błonowe. Stosując te metody wykryto, że większość białek wchodzących w skład mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów jest zgrupowana w trzech dużych enzymatycznych kompleksach oddechowych, z których każdy zawiera wiele odrębnych białek. W skład poszczególnych kompleksów wchodzą białka transbłonowe, które całość kompleksu białkowego mocno osadzają w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.



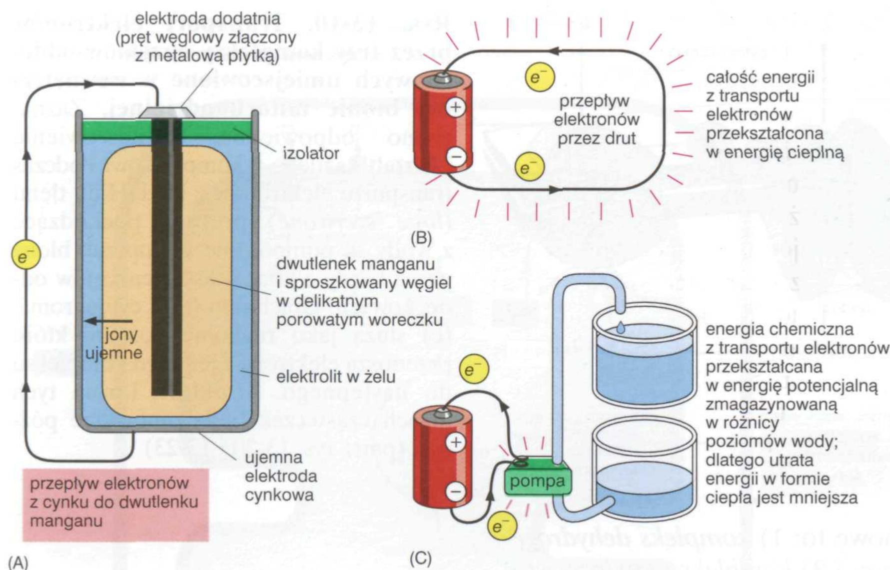
Rys. 13-10. Transport elektronów przez trzy kompleksy enzymów oddechowych umiejscowione w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Zaznaczono odpowiednie umiejscowienie i kształt każdego z kompleksów. Podczas transportu elektronów z NADH do tlenu (*linie czerwone*) protony pochodzące z wody są pompowane w poprzek błony przez każdy z kompleksów enzymów oddechowych. Ubichinon (Q) i cytochrom *c* (c) służą jako ruchome nośniki, które przenoszą elektrony z jednego kompleksu do następnego. Struktura i rola tych dwóch cząsteczek będą omówione później (patrz rys. 13-20 i 13-23)

Trzy enzymatyczne kompleksy oddechowe to: 1) *kompleks dehydrogenazy NADH*, 2) *kompleks cytochromów b-c*$_1$ i 3) *kompleks oksydazy cytochromowej*. Każdy zawiera jony metali i grupy chemiczne, które formują drogę dla elektronów przechodzących przez dany kompleks. Kompleksy oddechowe są miejscami pompowania protonów; każdy z nich można sobie wyobrazić jako białkową maszynę pompującą protony w poprzek błony w czasie, gdy przez kompleks przechodzą elektrony.

Transport elektronów rozpoczyna się, gdy usunięty z NADH jon wodorkowy (H:$^-$) zostanie przekształcony w proton i dwa elektrony o wysokiej energii: $H:^- \rightarrow H^+ + 2\,e^-$, tak jak uprzednio wyjaśniono na rysunku 13-8. Jak pokazano na rys. 13-10, reakcja ta jest katalizowana przez dehydrogenazę NADH, pierwszy z enzymatycznych kompleksów oddechowych przyjmujących elektrony. Następnie elektrony za pomocą ruchomych przenośników elektronów, które zostaną opisane później, przechodzą wzdłuż łańcucha kolejno do każdego z pozostałych kompleksów enzymatycznych. Wędrówka elektronów przez łańcuch jest energetycznie korzystna; elektron wyrusza z dużym ładunkiem energii, którą stopniowo traci na poszczególnych etapach drogi wzdłuż łańcucha. W końcu dociera do oksydazy cytochromowej, gdzie łączy się z cząsteczką O_2, aby wytworzyć wodę. Jest to więc etap oddychania komórkowego wymagający obecności tlenu i zużywający właśnie ten tlen, który wdychamy.

Transport elektronów powoduje powstanie gradientu protonowego w poprzek błony

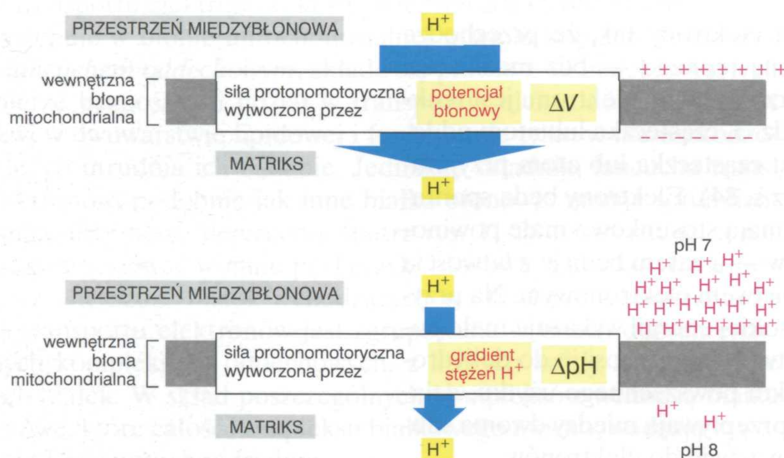
Białka łańcucha oddechowego prowadzą elektrony tak, że przechodzą one kolejno od jednego kompleksu do następnego — bez możliwości obejścia kompleksu na „skróty". Każde przeniesienie elektronu jest reakcją utleniania/redukcji: jak opisano w rozdz. 3, cząsteczka lub atom oddające elektron zostają utlenione, natomiast cząsteczka lub atom przyjmujące elektron stają się zredukowane (patrz s. 84). Elektrony będą spontanicznie przechodzić od cząsteczek, które mają stosunkowo małe powinowactwo do dostępnych dla nich elektronów — a zatem będą je z łatwością tracić — do cząsteczek z dużym powinowactwem elektronowym. Na przykład, NADH ze swoimi elektronami o wysokiej energii wykazuje małe powinowactwo do elektronów i dlatego z łatwością przenosi je do dehydrogenazy NADH. Baterie elektryczne, artykuł powszechnego użytku, działają na podobnej zasadzie, tzn. elektrony przepływają między dwoma substancjami chemicznymi o różnym powinowactwie do elektronów.



Rys. 13-11. Baterie elektryczne są zasilane przez reakcje chemiczne, których podstawą jest transport elektronów. (A) Standardowa bateria do flesza, w której elektrony przenoszone od cynku metalicznego (Zn) do atomu manganu w dwutlenku manganu (MnO_2) tworzą jako produkty Zn^{2+} i tlenek manganowy (MnO). (Węgiel w baterii służy tylko do przewodzenia elektronów). (B) Jeżeli zaciski baterii są bezpośrednio ze sobą połączone, cała energia uwolniona podczas transportu elektronów zostaje przekształcona w ciepło. (C) Jeżeli natomiast bateria jest podłączona do pompy, większość energii uwalnianej podczas transportu elektronów zostaje wykorzystana do pracy (w tym wypadku do pompowania wody). Komórka może podobnie wykorzystywać energię transportu elektronów do napędzania mechanizmu pompującego, jak zilustrowano to na rys. 13-3A

Gdy nie ma pośrednika wychwytującego energię wyzwalaną podczas transportu elektronów, energia ta po prostu zostaje uwalniana jako ciepło. Tak samo jak bateria może być połączona z urządzeniem pompującym wodę (rys. 13-11), komórka wykorzystuje większość energii przenoszonych elektronów dzięki posiadaniu białek, które potrafią pompować protony (H^+) na koszt transportowanych przez siebie elektronów. Energia uwalniana podczas transportu elektronów przez poszczególne enzymatyczne kompleksy oddechowe służy do odrywania protonów z wody ($H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$) w matriks mitochondrialnej, a następnie do ich przemieszczenia w poprzek błony do przestrzeni międzybłonowej. W rezultacie korzystny energetycznie przepływ elektronów przez łańcuch transportu elektronów wypompowuje z matriks protony na drugą stronę błony, tworząc elektrochemiczny gradient protonowy w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej (rys. 13-10). W ten sposób aktywne pompowanie protonów pociąga za sobą dwa ważne następstwa:

1. Wytwarza ono gradient stężenia protonów (H^+) w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej (gradient pH), wskutek czego pH w matriks jest prawie o jedną jednostkę wyższe (ok. 8) niż w przestrzeni międzybłonowej, gdzie wartość pH zazwyczaj zbliża się do 7. (Ponieważ H^+ analogicznie do małej cząsteczki przenika swobodnie



Rys. 13-12. Dwa składniki elektrochemicznego gradientu protonowego wytworzonego w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Całkowity gradient elektrochemiczny H^+ istniejący w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej składa się z dużej siły wynikającej z potencjału błonowego i mniejszej siły wynikającej z gradientu stężeń H^+. Obie siły razem tworzą całkowitą *siłę protonomotoryczną*, która wywiera presję na powrót H^+ do matriks

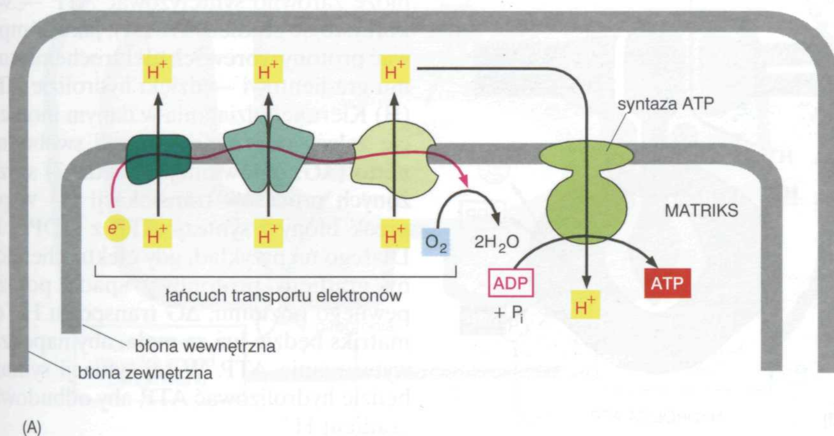
przez zewnętrzną błonę mitochondrium aż do osiągnięcia równowagi, pH w przestrzeni międzybłonowej jest takie samo jak w cytozolu). Tak więc w porównaniu z przestrzenią międzybłonową stężenie H^+ w matriks jest dziesięciokrotnie mniejsze.

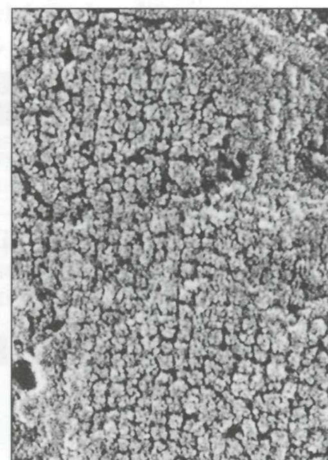
2. Wytwarza ono potencjał błonowy (omówiony w rozdz. 12) w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej w wyniku przepływu protonów, a więc jonów dodatnich, bez żadnych strat, tak że wewnątrz (od strony matriksowej) jest on ujemny, a na zewnątrz dodatni. Jak opisano w rozdz. 12, siła napędzająca bierny przepływ jonów, na przykład Na^+ czy K^+, przez błonę jest proporcjonalna do gradientu elektrochemicznego dla tego jonu poprzez błonę. To z kolei zależy od napięcia wytworzonego w poprzek błony, mierzonego jako potencjał błonowy i od gradientu stężenia jonu (patrz rys. 12-7). Ponieważ protony są naładowane dodatnio, będą się poruszać w poprzek błony z większą łatwością, jeżeli błona ma nadmiar ujemnych ładunków elektrycznych po drugiej stronie. W przypadku wewnętrznej błony mitochondrialnej gradient pH i potencjał błonowy pracują razem tworząc silny elektrochemiczny gradient protonowy, który stwarza bardzo korzystne energetycznie warunki wejścia H^+ z powrotem do matriks mitochondrialnej. We wszystkich błonach przekształcających energię, o których będziemy mówić w tym rozdziale, potencjał błonowy stanowi część siły napędowej wciągającej H^+ z powrotem poprzez błonę; stąd potencjał ten zwiększa ilość energii zmagazynowanej w gradiencie protonowym (rys. 13-12).

Pytanie 13-3. Kiedy dinitrofenol (DNP) zostanie dodany do mitochondriów, ich wewnętrzna błona staje się przepuszczalna dla protonów (H^+). Natomiast gdy do mitochondriów zostanie dodana nigerycyna, ich wewnętrzna błona staje się przepuszczalna dla K^+. (A) Jak zmieni się elektrochemiczny gradient protonowy pod wpływem DNP? (B) Jak zmieni się on reagując na nigerycynę?

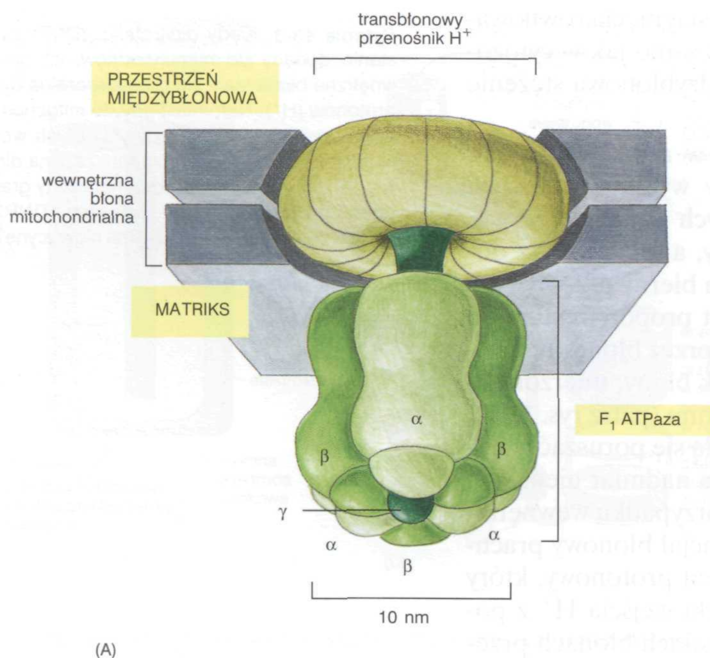
Gradient protonowy napędza syntezę ATP

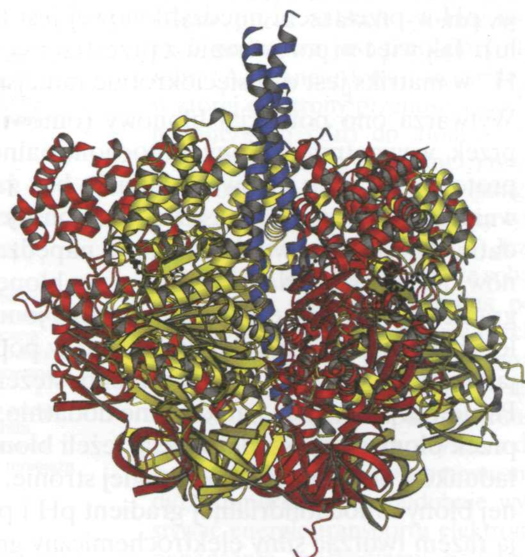
Elektrochemiczny gradient protonowy wytworzony w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej jest używany w procesie fosforylacji oksydacyjnej (rys. 13-13) do napędzania syntezy ATP. Działanie tego mechanizmu jest możliwe dzięki dużemu, związanemu z błoną enzymowi nazwanemu **syntazą ATP**. Enzym tworzy hydrofilową drogę w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej, co pozwala na przepływ protonów zgodnie z ich gradientem stężeń. Gdy jony pokonają drogę poprzez syntazę ATP, zostają użyte do niekorzystnej energetycznie reakcji zachodzącej między ADP i P_i, w której powstaje ATP (rys. 2-22). Syntaza ATP ma bardzo dawne pochodzenie; taki sam enzym występuje w mitochondriach komórek zwierzęcych, w chloroplastach roślin i sinic oraz w komórkowych błonach bakterii.





Rys. 13-13. Ogólny mechanizm fosforylacji oksydacyjnej. (A) Gdy elektron o wysokiej energii przechodzi wzdłuż łańcucha transportu elektronów, część uwalnianej energii zostaje użyta do pompowania H^+ z matriks przez trzy kompleksy enzymów oddechowych. Powstały w poprzek wewnętrznej błony elektrochemiczny gradient protonowy kieruje H^+ z powrotem poprzez syntazę ATP, transbłonowy kompleks białkowy, który energię przepływu H^+ używa w matriks do syntezy ATP z ADP i P_i. (B) Mikrofotografia elektronowa wewnętrznej powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej w komórce roślinnej. Widać gęsto upakowane cząstki, które są wystającymi fragmentami syntazy ATP i kompleksów łańcucha oddechowego

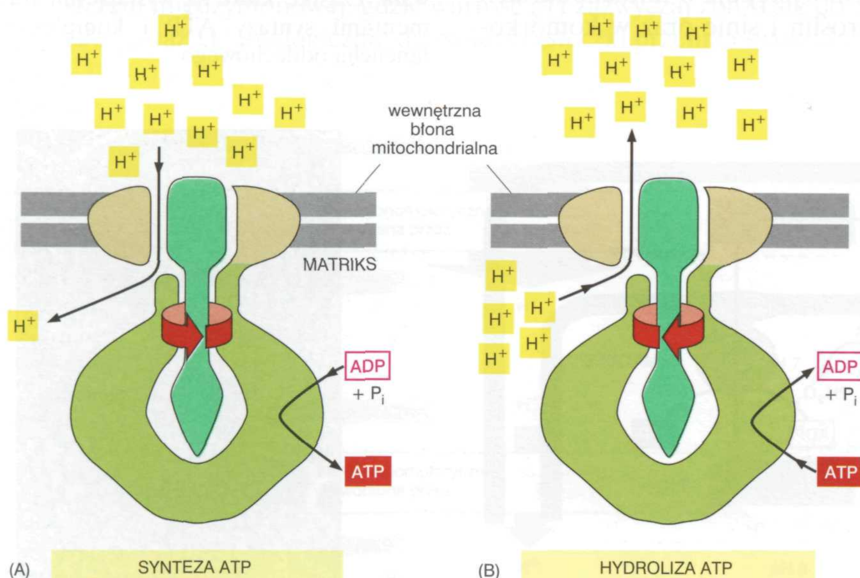




Rys. 13-14. Syntaza ATP. (A) Schematyczny diagram. Enzym, F_0F_1ATPaza, składa się z części stanowiącej główkę — F_1 i transbłonowego kanału H^+, nazwanego F_0. Oba elementy są utworzone z wielu podjednostek. Literami greckimi oznaczono poszczególne podjednostki ATPazy F_1. (B) Trójwymiarową strukturę ATPazy F_1 określono metodą krystalografii promieni X. Ta część syntazy ATP zawdzięcza swoją nazwę zdolności do przeprowadzania odwracalnej reakcji syntezy ATP — gdy zostanie odłączona od części transbłonowej, hydrolizuje ona ATP do ADP i P_i. (B dzięki uprzejmości: John Walker © Nature)

Strukturę syntazy ATP przedstawiono na rys. 13-14. Jest to duże białko składające się z wielu podjednostek. Wystająca z wewnętrznej błony mitochondrialnej w kierunku matriks duża część enzymu kształtem przypominająca główkę lizaka, jest przymocowana do transbłonowego kanału dla protonów za pomocą zbudowanego z wielu podjednostek „trzonka". Chociaż nie opracowano jeszcze szczegółowego mechanizmu działania enzymu, uważa się, że protony przechodząc przez transbłonowy kanał powodują szybkie obracanie się trzonka wewnątrz główki, co pobudza ją do syntezy ATP. Syntaza potrafi wytwarzać ponad 100 cząsteczek ATP na sekundę, a do produkcji każdej cząsteczki ATP jest konieczne przejście trzech protonów przez to zdumiewające urządzenie.

Syntaza ATP jest mechanizmem sprzężonym, działającym odwracalnie. Potrafi ona wykorzystać do syntezy ATP przepływ protonów zgodny z ich elektrochemicznym gradientem (jest to jej normalna rola w mitochondriach i komórkowych błonach bakterii rosnących tlenowo) lub użyć energię hydrolizy ATP do pompowania protonów w poprzek błony, podobnie



Rys. 13-15. Syntaza ATP jest działającym odwracalnie urządzeniem sprzęgającym, które może zamieniać energię elektrochemicznego gradientu protonowego w energię wiązań chemicznych lub odwrotnie. Syntaza ATP może zarówno syntetyzować ATP — wykorzystując gradient H^+ (A), jak i pompować protony wbrew ich elektrochemicznemu gradientowi — dzięki hydrolizie ATP. (B) Kierunek działania w danym momencie zależy od zmiany energii swobodnej netto (ΔG, omówionej w rozdz. 3) sprzężonych procesów translokacji H^+ w poprzek błony i syntezy ATP z ADP i P_i. Dlatego na przykład, gdy elektrochemiczny gradient protonowy spada poniżej pewnego poziomu, ΔG transportu H^+ do matriks będzie już za mała, aby napędzać wytwarzanie ATP. W tej sytuacji syntaza będzie hydrolizować ATP, aby odbudować gradient H^+

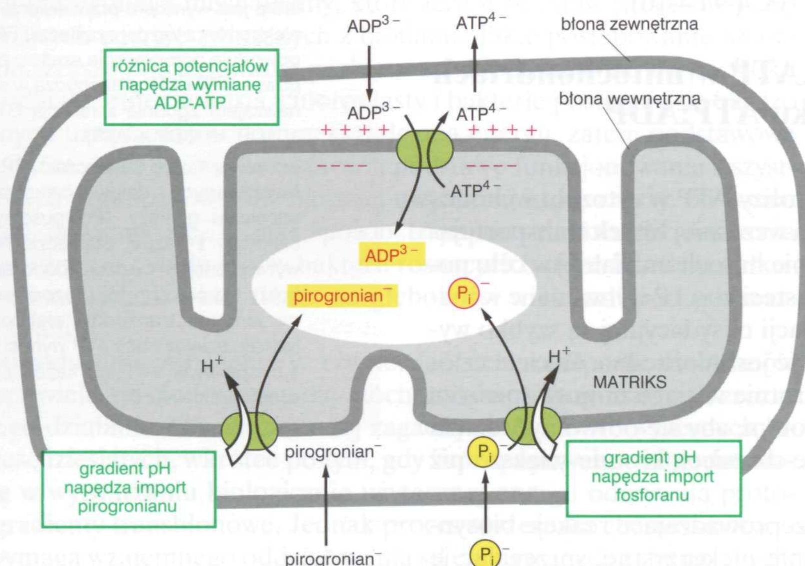
jak pompy H^+ opisane w rozdz. 12 (rys. 13-15). To, czy syntaza ATP najpierw wytwarza, czy najpierw zużywa ATP, zależy od wielkości elektrochemicznego gradientu protonowego wytworzonego w poprzek błony, w której enzym jest umiejscowiony. W wielu bakteriach rosnących zarówno tlenowo, jak i beztlenowo, gdy bakteria wyczerpie O_2, syntaza ATP podczas pracy rutynowo odwraca kierunek reakcji. W tej sytuacji syntaza ATP wykorzystuje do pompowania protonów na zewnątrz komórki ATP powstały w komórce przez glikolizę, tworząc gradient protonowy potrzebny bakterii do aktywnego transportu niezbędnych dla niej substancji pokarmowych.

Pytanie 13-4. Szczególne właściwości, które pozwalają syntazie ATP na działanie w obydwu kierunkach, umożliwiają wzajemne przekształcanie energii zmagazynowanej w gradiencie protonowym i energii zmagazynowanej w ATP, niezależnie od kierunku reakcji. (A) Gdyby syntazę ATP właśnie syntetyzującą ATP przyrównać do napędzanej wodą turbiny, wskaż, co mogłoby stanowić właściwą analogię, kiedy pracuje ona w odwrotnym kierunku? (B) W jakich warunkach można by oczekiwać, że syntaza ATP zatrzyma się i nie będzie się obracać ani do przodu, ani wstecz? (C) Co narzuca kierunek działania syntazy ATP?

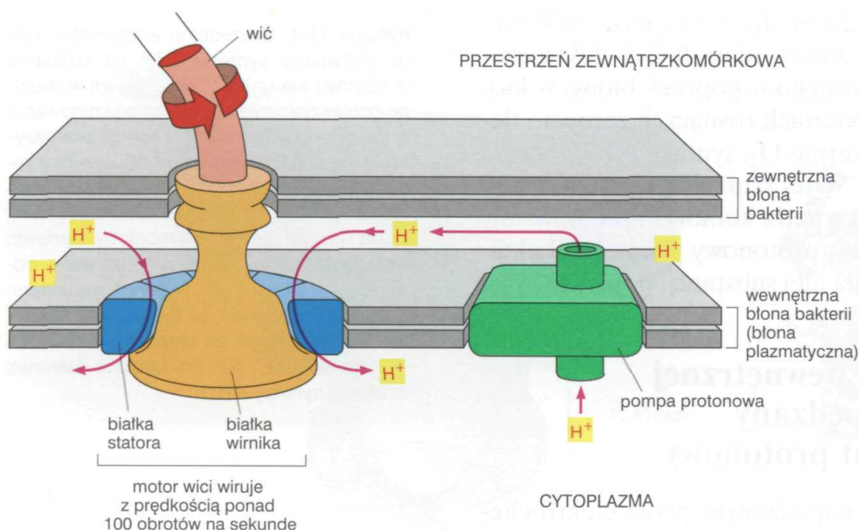
Sprzężony transport w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej jest napędzany przez elektrochemiczny gradient protonowy

Synteza ATP nie jest jedynym procesem napędzanym przez elektrochemiczny gradient protonowy. W mitochondriach wiele naładowanych cząsteczek, na przykład pirogronian, ADP i P_i, jest pompowanych do matriks z cytozolu, natomiast inne cząsteczki, takie jak ATP, muszą być przenoszone w przeciwnym kierunku. Wiele przenośników białkowych sprzęga transport do matriks mitochondrialnej z uprzywilejowanym energetycznie przepływem H^+. Tak więc pirogronian i fosforan nieorganiczny (P_i) są kotransportowane z zewnątrz razem z H^+ (symport), który przechodzi z nimi do matriks. Natomiast ADP i ATP są transportowane w przeciwnych kierunkach (antyport) przez jedno białko przenośnikowe. Ponieważ cząsteczka ATP ma o jeden ładunek ujemny więcej niż ADP, każda wymiana nukleotydów powoduje w sumie wyjście z mitochondrium jednego ładunku ujemnego. Antyport ADP–ATP jest więc napędzany przez różnicę ładunków po obu stronach błony (rys. 13-16).

W komórkach eukariotycznych gradient protonowy jest konsekwentnie wykorzystywany zarówno do napędzania syntezy ATP, jak i do transportu niektórych metabolitów przez wewnętrzną błonę mitochondrialną. U bakterii gradient protonowy wytworzony w poprzek bakteryjnej błony komórkowej służy wszystkim wymienionym wyżej funkcjom, a dodatkowo jest sam w sobie ważnym źródłem energii wykorzystywanej bezpośrednio: w poruszających się bakteriach gradient napędza szybki ruch obrotowy bakteryjnej wici, który popycha bakterię do przodu (rys. 13-17).



Rys. 13-16. Niektóre procesy aktywnego transportu poprzez wewnętrzną błonę mitochondrialną, napędzane przez elektrochemiczny gradient protonowy. Pirogronian, fosforan nieorganiczny i ADP są przenoszone do matriks, natomiast ATP jest wyprowadzany na zewnątrz. Przy każdej z transportowanych cząsteczek zaznaczono ładunek w celu porównania z potencjałem błonowym, który — jak zaznaczono — jest ujemny wewnątrz. Błona zewnętrzna swobodnie przepuszcza wszystkie te cząsteczki. Aktywny transport cząsteczek przenoszonych w poprzek błon przez przenośniki białkowe omówiono w rozdz. 12



Rys. 13-17. Ruch obrotowy wici bakterii jest napędzany przez przepływ H^+. Wić jest przytwierdzona do szeregu białkowych pierścieni (zaznaczonych kolorem *pomarańczowym*), obracających się wraz z nią, a osadzonych w otoczce i w błonie komórkowej bakterii. Rotacja jest napędzana przez przepływ protonów poprzez zewnętrzny pierścień białek (*stator* zaznaczony kolorem *niebieskim*) za pomocą nie poznanego jeszcze mechanizmu*

* Obecnie wiadomo, że analogiczny mechanizm umożliwia działanie syntazy ATP; patrz rozdz. Mitochondria w: *Podstawy cytofizjologii*, red. J. Kawiak i in., PWN, Warszawa 1998 (*przyp. tłum.*).

Gradienty protonowe wytwarzają większość komórkowego ATP

Jak ustalono uprzednio, sama glikoliza daje 2 cząsteczki ATP netto na każdą cząsteczkę glukozy, co stanowi całkowity zysk energetyczny z procesu fermentacji zachodzącego w nieobecności O_2 (co omówiono w rozdz. 4). Natomiast podczas fosforylacji oksydacyjnej każda para elektronów oddawanych przez NADH powstający w mitochondriach dostarcza energii do tworzenia ok. 2,5 cząsteczek ATP, jeśli uwzględni się energię potrzebną do transportu tego ATP do cytozolu. Podczas fosforylacji oksydacyjnej powstaje również 1,5 cząsteczki ATP na parę elektronów pochodzących z $FADH_2$ lub z cząsteczek NADH powstałych w cytozolu podczas glikolizy. Wydajność produktów glikolizy i cyklu kwasu cytrynowego, podsumowaną w tab. 13-1, można łatwo obliczyć; całkowite utlenianie cząsteczki glukozy — zaczynając od glikolizy, a kończąc na fosforylacji oksydacyjnej — daje netto ok. 30 cząsteczek ATP. Tak więc ogromna większość ATP wytwarzanego w komórkach zwierzęcych podczas utleniania glukozy jest syntetyzowana dzięki chemiosmotycznemu mechanizmowi, działającemu w błonie mitochondrialnej. Duża ilość ATP jest wytwarzana w mitochondriach także podczas utleniania tłuszczów, które dostarcza NADH i $FADH_2$ do fosforylacji oksydacyjnej (tab. 13-1; patrz również rys. 4-9 i 4-10).

Szybkie fosforylowanie ADP do ATP w mitochondriach utrzymuje dużą wartość stosunku ATP:ADP w komórkach

Cząsteczki ADP wytwarzane podczas hydrolizy ATP w cytozolu wchodzą do mitochondriów za pomocą omówionych wcześniej białek transportujących, umiejscowionych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej w celu ponownego „naładowania się", natomiast cząsteczki ATP wytwarzane w matriks mitochondrialnej w procesie fosforylacji oksydacyjnej są szybko wyprowadzone do cytozolu, gdzie ich obecność jest niezbędna. W ciele człowieka statystyczna cząsteczka ATP wielokrotnie w ciągu minuty opuszcza mitochondrium i wraca jako ADP z powrotem, aby się odtworzyć, dzięki czemu stężenie ATP w komórce jest stale dziesięciokrotnie większe niż stężenie ADP.

Jak wspomniano w rozdz. 3, enzymy przeprowadzające reakcje biosyntezy często napędzają reakcje energetycznie niekorzystne, sprzęgając je

Pytanie 13-5

A. Oblicz ilość cząsteczek ATP syntetyzowanych na parę elektronów przeniesioną z NADH do tlenu, jeżeli.......
1. na każdy elektron przeniesiony przez trzy enzymatyczne kompleksy oddechowe przypada pięć protonów wypompowanych w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej,
2. trzy protony muszą przejść poprzez syntazę ATP podczas syntezy każdej cząsteczki ATP z ADP i fosforanu nieorganicznego wewnątrz mitochondrium i
3. jeden proton zostaje użyty do tworzenia takiej różnicy potencjałów gradientu, jaka jest niezbędna do transportu każdej cząsteczki ATP z mitochondrium do cytozolu, gdzie jest ona zużywana.

B. Skorzystaj z informacji zawartych w tab. 13-1 łącznie z twoim wyliczeniem wydajności ATP na parę elektronów i oblicz.....
1. liczbę cząsteczek ATP syntetyzowanych na cząsteczkę glukozy w wyniku działania samego cyklu kwasu cytrynowego. (Przypuśćmy, że utlenianie, które jest wynikiem przeniesienia pary elektronów z każdej cząsteczki $FADH_2$, powoduje pompowanie sześciu protonów, a GTP i ATP przechodzą w siebie nawzajem zgodnie z reakcją GTP + + ADP $\rightleftharpoons$ GDP + ATP).
2. całkowitą liczbę cząsteczek ATP syntetyzowanych dzięki całkowitemu utlenianiu glukozy. (Przypuśćmy, że elektrony z każdej cząsteczki NADH wytwarzanej w cytozolu podczas glikolizy też przechodzą [bezpośrednio] na łańcuch transportu elektronów; jednakże wydajność ATP wynosi tylko 1,5 cząsteczki ATP na każdą z tych cząsteczek NADH).

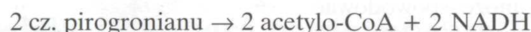
Tabela 13-1. Wydajność otrzymywania produktów z utleniania cukrów i tłuszczów

A. Produkty utleniania netto jednej cząsteczki glukozy

W cytozolu (glikoliza)


glukoza → 2 cz. pirogronianu + 2 NADH + 2 ATP

W mitochondrium (dehydrogenaza pirogronianowa i cykl kwasu cytrynowego)


2 cz. pirogronianu → 2 acetylo-CoA + 2 NADH


2 acetylo-CoA → 6 NADH + 2 $FADH_2$ + 2 GTP

Wynik końcowy netto w mitochondrium


2 cz. pirogronianu → 8 NADH + 2 $FADH_2$ + 2 GTP

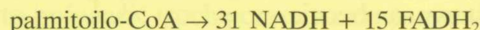
B. Produkty utleniania netto jednej cząsteczki palmitoilo-CoA (zaktywowana forma kwasu tłuszczowego, palmitynowego)

W mitochondrium (utlenianie kwasu tłuszczowego i cykl kwasu cytrynowego)


palmitoilo-CoA → 8 acetylo-CoA + 7 NADH + 7 $FADH_2$


8 acetylo-CoA → 24 NADH + 8 $FADH_2$

Wynik końcowy netto w mitochondrium


palmitoilo-CoA → 31 NADH + 15 $FADH_2$

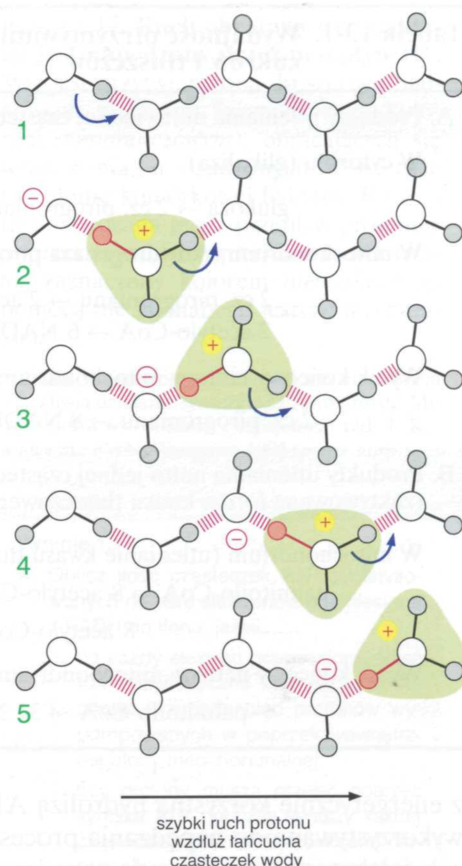
z energetycznie korzystną hydrolizą ATP (patrz rys. 3-24). Pula ATP jest wykorzystywana do napędzania procesów komórkowych w taki sam sposób, jak bateria stosowana do napędzania urządzeń elektrycznych: gdy aktywność mitochondriów ustanie, to poziom ATP spadnie i baterie komórki wyczerpią się; reakcje niekorzystne energetycznie nie będą przez dłuższy czas zasilane i w końcu komórka umrze. Właśnie w ten sposób działa jako trucizna cyjanek, który blokuje transport elektronów w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

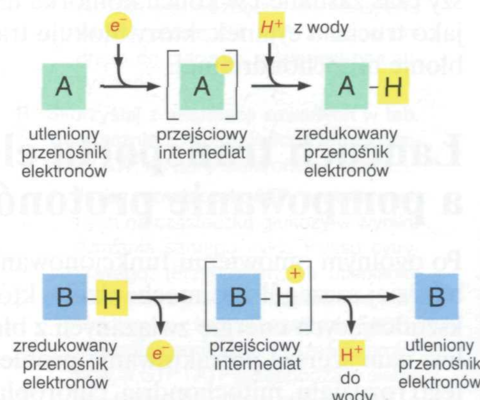
Łańcuch transportu elektronów a pompowanie protonów

Po ogólnym omówieniu funkcjonowania mitochondriów musimy poznać bardziej szczegółowo mechanizmy, które leżą u podstaw procesów przekształcających energię związanych z błonami. Takie postępowanie umożliwi nam szersze potraktowanie problemu. Jak podkreślono na początku tego rozdziału, mitochondria, chloroplasty i bakterie posługują się bardzo podobnymi urządzeniami do przekształcania energii, zatem podstawowe zasady, które dalej omówimy, stanowią podstawę funkcjonowania wszystkich żywych organizmów. Aby bardziej uwydatnić istotę rzeczy, na końcu rozdziału dowiemy się, w jaki sposób transport elektronów dostarcza energię jednemu z wielu typów bakterii rosnących bardzo licznie w całkowitych ciemnościach i bez tlenu, na głębokości wielu mil pod powierzchnią oceanu.

Z powodu umiejscowienia w błonie, łańcuch transportu elektronów był przez wiele lat niedostępny dla biochemików, którzy usiłowali zrozumieć jego działanie. Rozwiązanie tej zagadki nastąpiło we wczesnych latach sześćdziesiątych, wkrótce po tym, gdy zaproponowano, że podstawową rolę w wytwarzaniu biologicznie użytecznej energii odgrywają protonowe gradienty transbłonowe. Jednak proces sprzężenia chemiosmotycznego wymaga wzajemnego oddziaływania sił elektrycznych i chemicznych,

Rys. 13-18. **Jak protony zachowują się w wodzie.** (A) Protony poruszają się bardzo szybko wzdłuż łańcucha utworzonego z cząsteczek wody powiązanych wiązaniami wodorowymi. Przeskoki protonów zaznaczono na rysunku *niebieskimi strzałkami*, a jony hydroniowe zacieniowano kolorem *zielonym*. Jak omówiono w rozdz. 2, „nagie" protony zdarzają się bardzo rzadko, natomiast zazwyczaj są związane z cząsteczkami wody w postaci jonów hydroniowych H_3O^+. W pH obojętnym (pH 7,0) stężenie jonów hydroniowych wynosi 10^{-7} M; jednakże dla uproszczenia zwykle podaje się to jako stężenie H^+ (10^{-7} M) (patrz panel 2-2, s. 50–51). (B) Transport elektronów może spowodować przeniesienie całych atomów wodoru, ponieważ wewnątrz komórek protony są z łatwością przejmowane z wody lub oddawane do niej. W tym przykładzie: A — gdy jest redukowany, odbiera elektron plus proton, a B — gdy jest utleniany, oddaje elektron plus proton





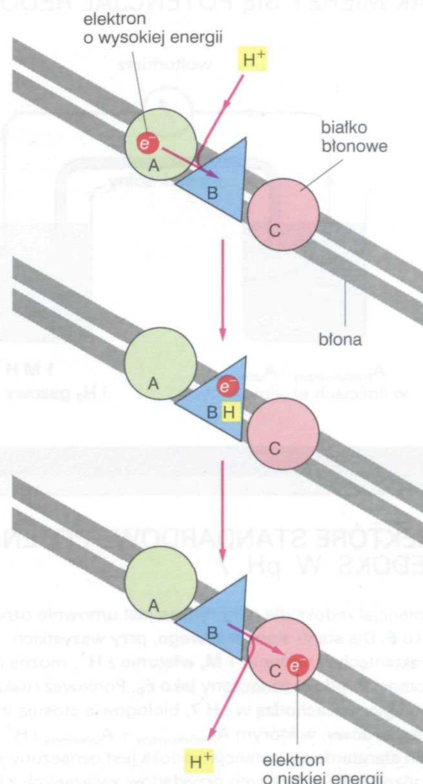
co nie jest łatwe do rozszyfrowania na poziomie molekularnym; rzeczywiście, pomysł był tak nowatorski, że nie miał szans na powszechną akceptację, aż do momentu nagromadzenia dalszych dowodów uzyskanych z doświadczeń zaplanowanych w celu sprawdzenia tej hipotezy, co nastąpiło kilka lat później.

Chociaż naukowcy jeszcze dzisiaj prowadzą badania nad szczegółami dotyczącymi sprzężenia chemiosmotycznego, to jego podstawy są obecnie zrozumiałe. W tej części rozdziału przyjrzymy się niektórym regułom, które leżą u podstaw procesu transportu elektronów i wyjaśniają, w jaki sposób wytwarza on gradient protonowy.

Protony są z łatwością przemieszczane dzięki transportowi elektronów

Aczkolwiek protony przypominają sposobem przemieszczania się w poprzek błony inne jony dodatnie, na przykład Na^+ czy K^+, pod pewnym względem są one unikatowe. Atomy wodorowe są bez wątpienia najliczniejszym rodzajem atomów w organizmach żywych i występują obficie nie tylko w cząsteczkach biologicznych zawierających węgiel, ale także w cząsteczkach otaczającej je wody. Protony w wodzie są bardzo ruchliwe i „trzepoczą" się w sieci wiązań wodorowych łączących cząsteczki wody, szybko oddysocjowując od jednej cząsteczki wody po to, aby się przyłączyć do sąsiedniej cząsteczki, co pokazano na rys. 13-18A. Tak więc woda, która w komórce znajduje się wszędzie, służy jako gotowy zbiornik do oddawania i przyjmowania protonów. Zawsze, ilekroć cząsteczka jest redukowana przez nabyty elektron (e^-), przynosi on ze sobą ładunek ujemny. W wielu przypadkach ładunek ten zostaje szybko zneutralizowany przez proton (H^+) pochodzący z wody, tak że całkowity efekt redukcji sprowadza się do przeniesienia kompletnego atomu wodoru, tzn. $H^+ + e^-$ (rys. 13-18B). Podobnie, kiedy cząsteczka jest utleniana, atom wodoru może łatwo dysocjować do swoich części składowych, elektronu i protonu, co umożliwia oddzielne przeniesienie elektronu do cząsteczki, która przyjmuje ten elektron, natomiast proton przechodzi do wody. Dlatego w błonie, w której elektrony przechodzą wzdłuż łańcucha transportu elektronów, pompowanie protonów z jednej strony błony na drugą jest w zasadzie względnie proste. Jedyny warunek, to taki sposób ustawienia przenośnika elektronów w błonie, który spowoduje przejście protonu na drugą stronę błony, wtedy gdy przenośnik przyjmuje elektron, a następnie uwolnienie tego protonu po drugiej stronie błony, gdy elektron przechodzi do następnego przenośnika w łańcuchu (rys. 13-19).

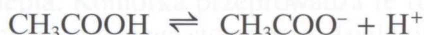
Rys. 13-19. W jaki sposób protony mogą być pompowane w poprzek błony. Gdy elektron przechodzi wzdłuż łańcucha transportu elektronów, może wiązać lub uwalniać proton na każdym etapie. Na tym schematycznym diagramie przenośnik elektronów B odbiera protony (H^+) z jednej strony błony wówczas, gdy przyjmuje elektron (e^-) od przenośnika A; uwalnia on proton po drugiej stronie błony wtedy, gdy oddaje ten elektron do przenośnika C



Potencjał redoks jest miarą powinowactwa do elektronów

W reakcjach biochemicznych elektrony usuwane z jednej cząsteczki zawsze przechodzą do drugiej tak, że gdy pierwsza cząsteczka zostaje utleniona, to druga jest zredukowana. Podobnie jak w innych reakcjach chemicznych, w reakcjach oksydoredukcyjnych, czyli **reakcjach redoks**, tendencja do ich spontanicznego zachodzenia zależy od zmiany energii swobodnej (ΔG) transportu elektronów, a ta z kolei zależy od względnego powinowactwa dwóch cząsteczek do elektronów. (Rolę energii swobodnej w reakcjach chemicznych omówiono w rozdz. 3, s. 89).

Ponieważ transport elektronów dostarcza żywym organizmom większość energii, warto poświęcić trochę czasu na zrozumienie tego procesu. Wielu czytelników zapoznało się już wcześniej z kwasami i zasadami, które oddają i przyjmują protony (patrz panel 2-2, s. 50–51). Kwasy i zasady występują w parach sprzężonych kwas–zasada, gdzie kwas łatwo przechodzi w zasadę po oddaniu protonu. Na przykład kwas octowy (CH_3COOH) zostaje przekształcany w jego sprzężoną zasadę (CH_3COO^-) w reakcji:



$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

Z tego samego względu, para utworzona przez NADH i NAD^+ jest nazwana **parą redoks** — NADH po utracie elektronu zostaje przekształcony w NAD^+ w reakcji:

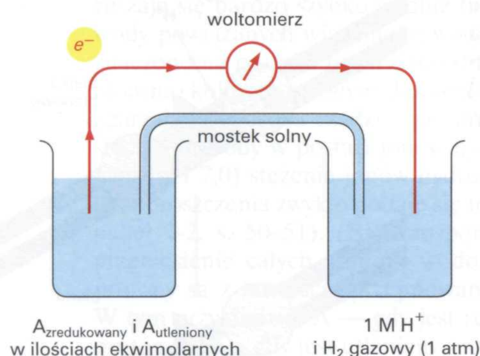


$$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^-$$

NADH jest silnym dawcą elektronów: ponieważ jego elektrony są przytrzymywane przez wiązanie o wysokiej energii, zmiana energii swobodnej podczas przejścia tych elektronów do wielu innych rodzajów cząsteczek jest korzystna (patrz rys. 13-8). Odwrotnie, utworzenie wiązania o wysokiej energii jest trudne i jego partner, NAD^+, jest z konieczności słabym biorcą elektronów.

Skłonność do przenoszenia elektronów z pary redoks można mierzyć doświadczalnie. W tym celu należy skonstruować obwód elektryczny, który łączy w stosunku ekwimolarnym (1:1) mieszaninę pary redoks z drugą parą redoks, wybraną arbitralnie jako odniesienie standardowe i mierzyć różnicę napięcia między nimi (panel 13-1, s. 426). Tę różnicę napięcia nazywamy **potencjałem redoks**; według definicji elektrony będą się poruszać spontanicznie od pary redoks NADH/NAD^+ o niskim potencjale redoks (małe powinowactwo do elektronów) do pary redoks O_2/H_2O o wysokim potencjale redoks (duże powinowactwo do elektronów). Stąd NADH jest cząsteczką nadającą się do oddawania elektronów na łańcuch oddechowy, natomiast O_2 przy zakończeniu łańcucha właściwie zmienia się w „zlewnię elektronów". Jak wyjaśniono w panelu 13-1, różnica potencjału redoks, $\Delta E_0'$ jest bezpośrednią miarą standardowej zmiany energii swobodnej ($\Delta G°'$) transportu elektronów z jednej cząsteczki na drugą.

JAK MIERZY SIĘ POTENCJAŁ REDOKS



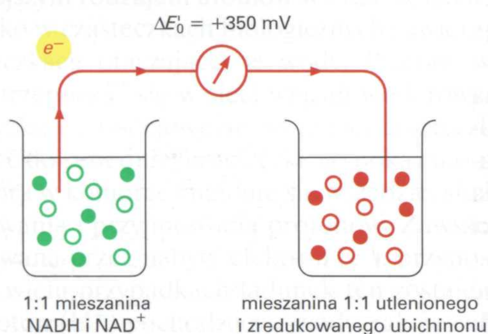
Jedna zlewka (*po lewej*) zawiera substancję A w ekwimolarnej mieszaninie zredukowanego ($A_{zredukowany}$) i utlenionego ($A_{utleniony}$) składnika jej pary redoks. Druga zlewka zawiera wodorowy standard referencyjny ($2\,H^+ + 2\,e^- \rightleftharpoons H_2$), którego potencjał redoks zgodnie z międzynarodową umową jest arbitralnie wyznaczony jako zero. (Mostek solny utworzony ze stężonego roztworu KCl pozwala jonom K^+ i Cl^- na ruch pomiędzy dwoma zlewkami, co jest potrzebne do neutralizacji ładunków w każdej zlewce, kiedy przepływają między nimi elektrony). Drut metalowy (kolor *czerwony*) umożliwia swobodny przepływ elektronów, a woltomierz mierzy w tym czasie potencjał redoks substancji A. Gdy elektrony płyną od $A_{zredukowanego}$ do H^+, jak zaznaczono na rysunku, para redoks utworzona przez substancję A wykazuje ujemny potencjał redoks. Natomiast gdy elektrony płyną od H_2 do $A_{utlenionego}$, to para redoks wykazuje potencjał redoks dodatni.

NIEKTÓRE STANDARDOWE POTENCJAŁY REDOKS W pH 7

Potencjał redoks dla pary redoks jest umownie oznaczony jako *E*. Dla stanu standardowego, przy wszystkich reaktantach w stężeniu 1 M, włącznie z H^+, można obliczyć potencjał redoks oznaczony jako E_0. Ponieważ reakcje biologiczne zachodzą w pH 7, biologowie stosują inny stan standardowy, w którym $A_{zredukowany} + A_{utleniony}$ i $H^+ = 10^{-7}$M. Ten standardowy potencjał redoks jest oznaczony jako E_0'. Podano kilka wybranych przykładów związanych z fosforylacją oksydacyjną.

reakcje redoks	potencjał redoks E_0'
$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^-$	−320 mV
zredukowany ubichinon $\rightleftharpoons$ utleniony ubichinon $+ 2H^+ + 2e^-$	+30 mV
zredukowany cytochrom *c* $\rightleftharpoons$ utleniony cytochrom *c* $+ e^-$	+230 mV
$H_2O \rightleftharpoons ½O_2 + 2H^+ + 2e^-$	+820 mV

OBLICZANIE $\Delta G°$ Z POTENCJAŁÓW REDOKS



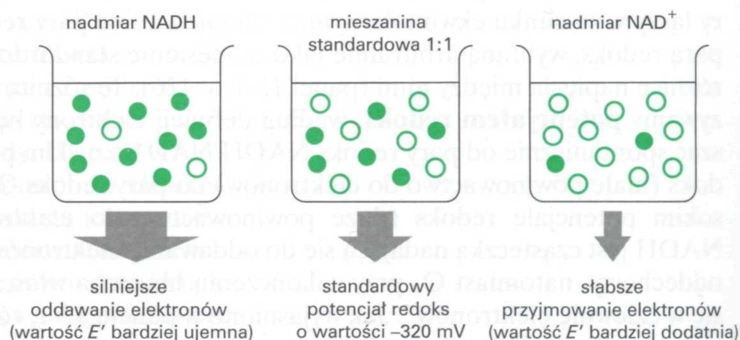
$\Delta G° = -33{,}5$ kJ/mol

$\Delta G° = -n(0{,}096)\,\Delta E'_0$, gdzie *n* wyraża liczbę elektronów przeniesionych przy zmianie potencjału redoks $\Delta E'_0$ miliwoltów (mV)

Przykład: Przeniesienie jednego elektronu z NADH do ubichinonu ma korzystną $\Delta G°$ o wartości −33,5 kJ/mol, natomiast przeniesienie jednego elektronu z ubichinonu do tlenu ma jeszcze bardziej korzystną $\Delta G°$ równą −76,2 kJ/mol. Wartość $\Delta G°$ dla przeniesienia jednego elektronu z NADH do tlenu jest sumą tych dwóch wartości, tj. −109,6 kJ/mol.

EFEKT ZMIAN STĘŻENIA

Jak wyjaśniono w rozdz. 3 (patrz s. 89), aktualna zmiana energii swobodnej reakcji, ΔG, zależy od stężenia reaktantów i ogólnie będzie różna od standardowej zmiany energii swobodnej, $\Delta G°$. Standardowe potencjały redoks wyznacza się dla mieszaniny pary redoks w proporcji 1:1. Na przykład, standardowy potencjał redoks −320 mV ustalono dla mieszaniny 1:1 NADH i NAD^+. Kiedy jednak NADH jest w nadmiarze nad NAD^+, elektron przenoszony z NADH do akceptora elektronu staje się bardziej uprzywilejowany. Jest to odzwierciedlone przez bardziej ujemny potencjał redoks i bardziej ujemną ΔG dla przeniesienia elektronu.



Transport elektronów uwalnia dużą ilość energii

Jak już powiedziano, te pary związków, które mają najbardziej ujemny potencjał redoks, charakteryzują się najsłabszym powinowactwem do elektronów, dlatego też zawierają grupy charakteryzujące się silną tendencją do oddawania elektronów. Przeciwnie, te pary, które mają najbardziej dodatni potencjał redoks, charakteryzują się silną tendencją do przyjmowania elektronów. Potencjał redoks mieszaniny NADH i NAD^+ w proporcji 1 : 1 wynosi –320 mV, co wskazuje, że NADH ma silną tendencję do oddawania elektronów; potencjał redoks mieszaniny H_2O i ½ O_2 w proporcji 1 : 1 wynosi +820 mV, co wskazuje, że O_2 ma silną tendencję do przyjmowania elektronów. Różnica potencjału redoks wynosi 1,14 V (1140 mV), co oznacza, że w warunkach standardowych transport każdego elektronu z NADH do O_2 jest bardzo korzystny, gdzie $\Delta G° = -109{,}6$ kJ/mol (–219,2 kJ/mol dla dwóch cząsteczek transportowanych przez NADH; patrz panel 13-1). Jeżeli porównamy te wartości zmiany energii swobodnej z otrzymanymi podczas tworzenia bezwodnikowych wiązań fosforanowych w ATP ($\Delta G° = -30{,}6$ kJ/mol, patrz rys. 4-7), zobaczymy, że podczas utleniania cząsteczki NADH uwalnia się dużo więcej energii, niż potrzeba jej do syntezy kilku cząsteczek ATP z ADP i P_i.

Układy żywe na pewno potrafiłyby wykształcić enzymy pozwalające NADH na oddawanie elektronów bezpośrednio na tlen, aby wytworzyć wodę w reakcji:

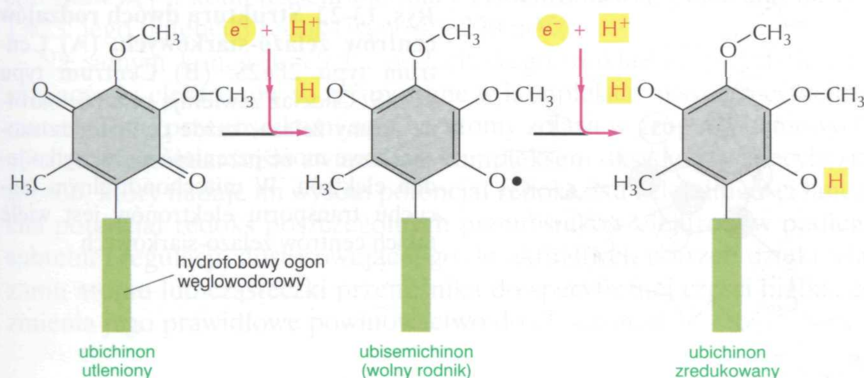


$$2\,H^+ + 2\,e^- + \tfrac{1}{2}\,O_2 \rightarrow H_2O$$

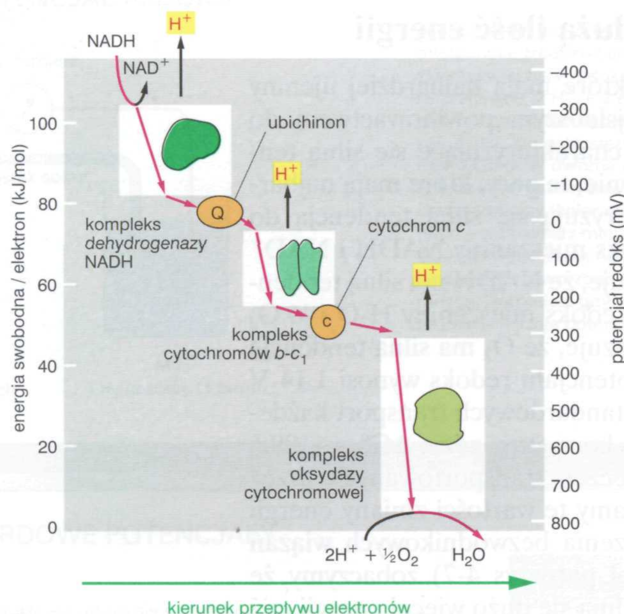
Jednakże z powodu olbrzymiego spadku energii swobodnej, ta reakcja przebiegałaby z siłą niemal równą eksplozji, a prawie cała energia ulotniłaby się w postaci ciepła. Komórka przeprowadza tę reakcję, ale robi to w taki sposób, że reakcja przebiega stopniowo, dzięki przenoszeniu przez łańcuch oddechowy elektronów o wysokiej energii z NADH do O_2 za pośrednictwem wielu przenośników elektronów. Ponieważ każdy z kolejnych przenośników łańcucha przytrzymuje swoje elektrony coraz mocniej, korzystna energetycznie reakcja $2\,H^+ + 2\,e^- + \tfrac{1}{2}\,O_2 \rightarrow H_2O$ jest rozłożona na kilka małych etapów. Umożliwia to zmagazynowanie blisko połowy uwolnionej energii, zamiast jej utraty w postaci ciepła uciekającego do środowiska.

Metale ściśle związane z białkami stanowią uniwersalne przenośniki elektronów

W łańcuchu oddechowym przenośniki elektronów są ułożone w kolejności według wzrastającego potencjału redoks, co umożliwia stopniowe



Rys. 13-20. Chinonowy przenośnik elektronów. W łańcuchu transportu elektronów ubichinon odbiera jeden H^+ ze środowiska wodnego z każdym przejmowanym elektronem, a może on przenosić jeden lub dwa elektrony jako część atomu wodoru (kolor *żółty*). Kiedy zredukowany ubichinon oddaje swoje elektrony do następnego przenośnika w łańcuchu, protony te zostają uwalniane. Ubichinon jest przytrzymywany w błonie przez długi hydrofobowy ogon zawierający 6–10 pięciowęglowych jednostek izoprenowych, przy czym ich liczba zależy od typu organizmu. W fotosyntetyzujących błonach chloroplastów odpowiednikiem chinonowego przenośnika elektronów jest plastochinon, który ma prawie identyczną strukturę. Dla uproszczenia ubichinon i plastochinon będą określane jako *chinony* o skróconym symbolu Q

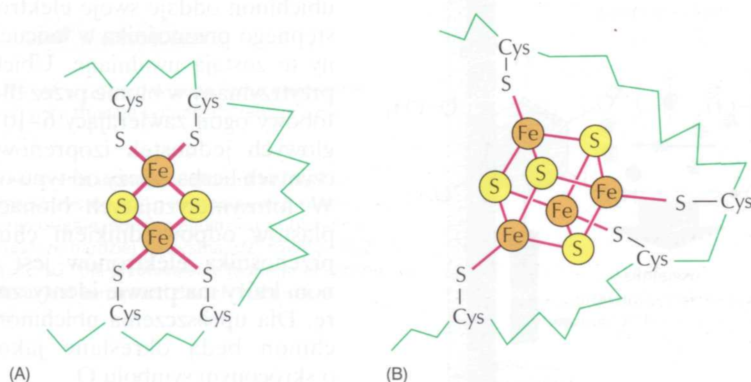


Rys. 13-21. Potencjał redoks wzrasta wzdłuż łańcucha transportu elektronów. Zastosowano tu oznaczenia takie jak na rys. 13-10. Zwróćmy uwagę, że duży wzrost potencjału redoks pojawia się w obrębie każdego z trzech kompleksów enzymów oddechowych, co jest konieczne do pompowania przez nie protonów

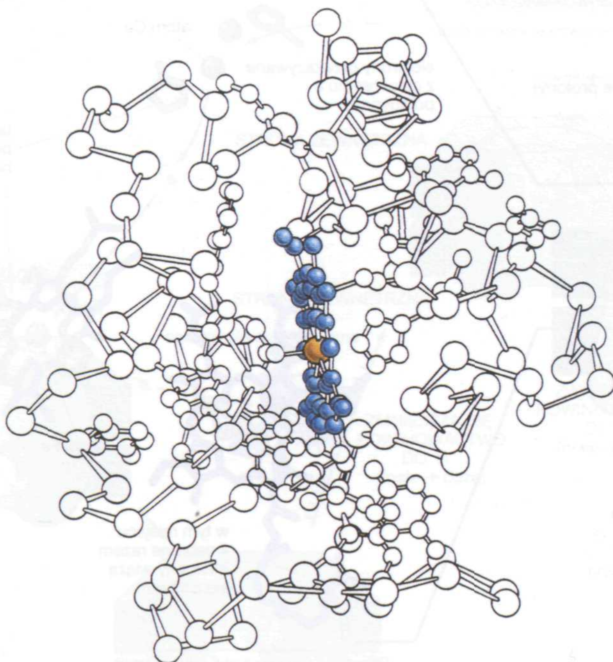
uwalnianie energii zmagazynowanej w elektronach NADH. W każdym z trzech enzymatycznych kompleksów oddechowych elektrony poruszają się głównie między atomami metali ściśle związanymi z białkami, przeskakując z jednego jonu metalu do następnego.

Natomiast między różnymi kompleksami oddechowymi elektrony są przenoszone przez cząsteczki, które dyfundując w dwuwarstwie lipidowej odbierają elektrony od jednego kompleksu i przekazują je do następnego w ustalonej kolejności. *Ubichinon*, mała hydrofobowa cząsteczka rozpuszczalna w dwuwarstwie lipidowej, jest jedynym przenośnikiem nie będącym częścią białka. W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym ubichinon odbiera elektrony z kompleksu dehydrogenazy NADH i oddaje je do kompleksu cytochromów bc_1 (patrz rys. 13-10). Jak pokazano na rys. 13-20, **chinon** (analog ubichinonu) może pobierać lub oddawać jeden lub dwa elektrony, przy czym z każdym przenoszonym elektronem zabiera on ze środowiska jeden H^+. Ujmując to w kategorii ubywania energii, potencjał redoks wynoszący +30 mV umiejscawia ubichinon ok. jednej czwartej drogi od NADH „w dół" łańcucha (rys. 13-21).

Wszystkie pozostałe przenośniki elektronów w łańcuchu oddechowym są małymi cząsteczkami ściśle związanymi z białkami. Pomiędzy NADH a ubichinonem, wewnątrz kompleksu dehydrogenazy NADH, elektrony przechodzą między grupą flawinową związaną z kompleksem białkowym



Rys. 13-22. Struktura dwóch rodzajów centrów żelazo-siarkowych. (A) Centrum typu 2Fe2S. (B) Centrum typu 4Fe4S. Chociaż zawierają one wielokrotne atomy żelaza, każde centrum żelazo-siarkowe może przenieść na raz tylko jeden elektron. W mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów jest wiele takich centrów żelazo-siarkowych



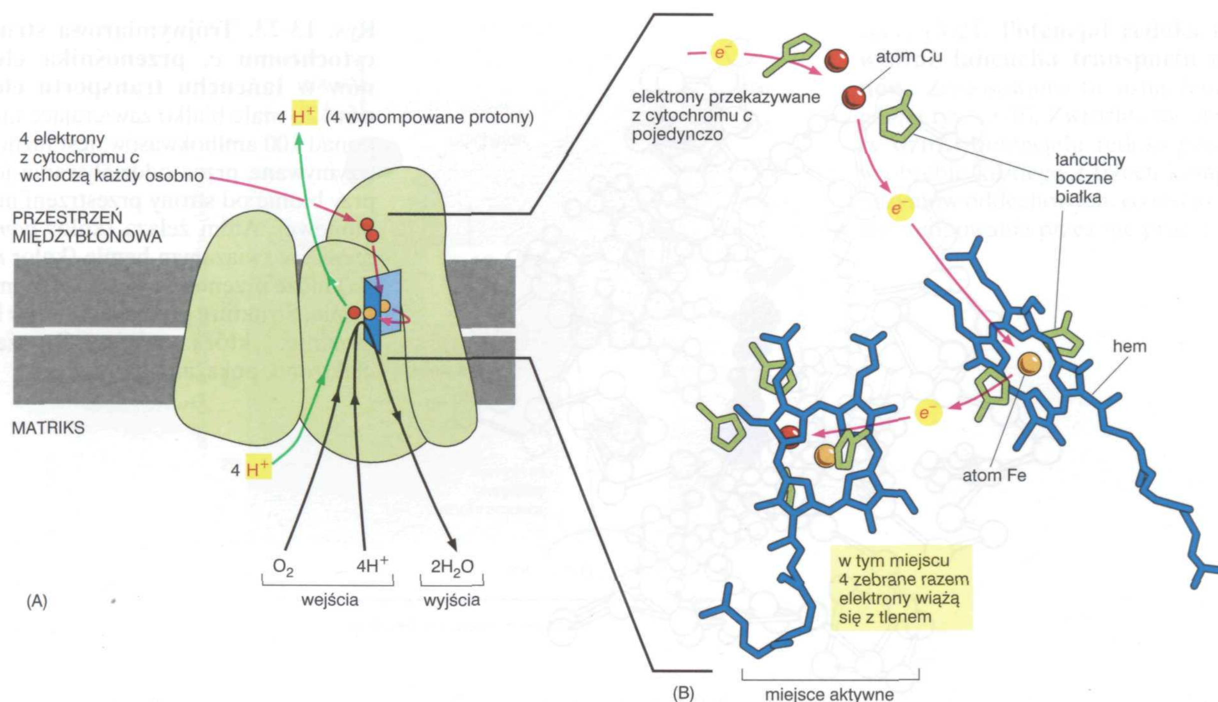
Rys. 13-23. Trójwymiarowa struktura cytochromu *c*, przenośnika elektronów w łańcuchu transportu elektronów. To małe białko zawierające niewiele ponad 100 aminokwasów, jest luźno przytrzymywane przez oddziaływania jonowe przy błonie od strony przestrzeni międzybłonowej. Atom żelaza (kolor *pomarańczowy*) w związanym hemie (kolor *niebieski*) może przenosić tylko po jednym elektronie. Strukturę grupy hemowej w hemoglobinie, która wiąże O_2 zamiast elektronu, pokazano na rys. 5-31

(patrz struktura na rys. 4-12) a centrami żelazo-siarkowymi, ułożonymi według wzrastającego potencjału oksydoredukcyjnego. **Centra żelazo--siarkowe** mają strukturę podobną do pokazanej na rys. 13-22 i przenoszą jednorazowo po jednym elektronie. Ostatnie centrum żelazo-siarkowe w dehydrogenazie oddaje elektrony do ubichinonu.

Centra żelazo-siarkowe mają względnie małe powinowactwo do elektronów, dlatego są mniej przydatne w dalszym odcinku łańcucha transportu elektronów, na drodze prowadzącej od ubichinonu do O_2. W tym fragmencie drogi, np. w kompleksie cytochromów bc_1 i w kompleksie oksydazy cytochromowej, jako przenośniki elektronów są powszechnie używane atomy żelaza w grupach hemowych, ściśle związanych z białkami cytochromowymi. **Cytochromy** tworzą rodzinę kolorowych białek (stąd ich nazwa, po grecku *chroma* oznacza „kolor"); każdy z nich zawiera jedną lub więcej grup hemowych, których atom żelaza w zależności od tego, czy przyjął elektron, ulega przemianie z formy żelazowej (Fe III) do formy żelazawej (Fe II). Jak można się było spodziewać, potencjał redoks różnych cytochromów wzrasta, gdy jeden elektron pokonuje kolejne etapy łańcucha oddechowego, dążąc w kierunku tlenu. Strukturę *cytochromu c*, małej cząsteczki, przerzucającej elektrony pomiędzy kompleksem cytochromów bc_1 a kompleksem oksydazy cytochromowej, pokazano na rys. 13-23: jego potencjał redoks wynosi +230 mV.

Na samym końcu łańcucha oddechowego, dokładnie przed tlenem, przenośniki elektronów są zgrupowane w kompleksie oksydazy cytochromowej. Tutaj przenośnikami są albo atomy żelaza w grupach hemowych, albo atomy miedzi ściśle związane z kompleksem oksydazy w specyficzny sposób, który nadaje im wysoki potencjał redoks. Na całej długości łańcucha potencjał redoks poszczególnych przenośników elektronów podlega subtelnej regulacji, dostosowującej go do aktualnych potrzeb dzięki wiązaniu atomu lub cząsteczki przenośnika do specyficznej części białka, co zmienia jego prawidłowe powinowactwo do elektronów.

Pytanie 13-6. Na wielu etapach łańcucha transportu elektronów jony Fe wchodzące w skład hemu lub centrów Fe-S są używane do przejściowego wiązania elektronów. Dlaczego te grupy funkcyjne, które chemicznie przenoszą transportowany elektron, muszą być związane z białkiem? Podaj kilka różnych powodów, dlaczego to jest konieczne.



Rys. 13-24. Kompleks oksydazy cytochromowej. (A) Reakcja katalizowana przez oksydazę cytochromową. Kształt i ułożenie pokazanych trzech podjednostek są oparte na kompletnej strukturze określonej metodą dyfrakcji promieni X. Wewnętrzna powierzchnia błony jest skierowana w mitochondriach do matriks, a w bakteriach tlenowych do cytoplazmy. (B) Szczegółowe przedstawienie miejsca aktywnego zaznaczonego na rysunku (A), pokazujące lokalizację związanych z białkiem jonów metali, które przenoszą elektrony z cytochromu *c* do tlenu (O_2). Jak w (A), dwa atomy żelaza (Fe) zaznaczono kolorem *pomarańczowym*, trzy atomy miedzi — *czerwonym*, a dwa hemy zawierające atom Fe — *niebieskim*. Wszystkie jony metali są schowane wewnątrz białka, a zjawisko przeskakiwania elektronów pomiędzy nimi nazwano efektem tunelowym

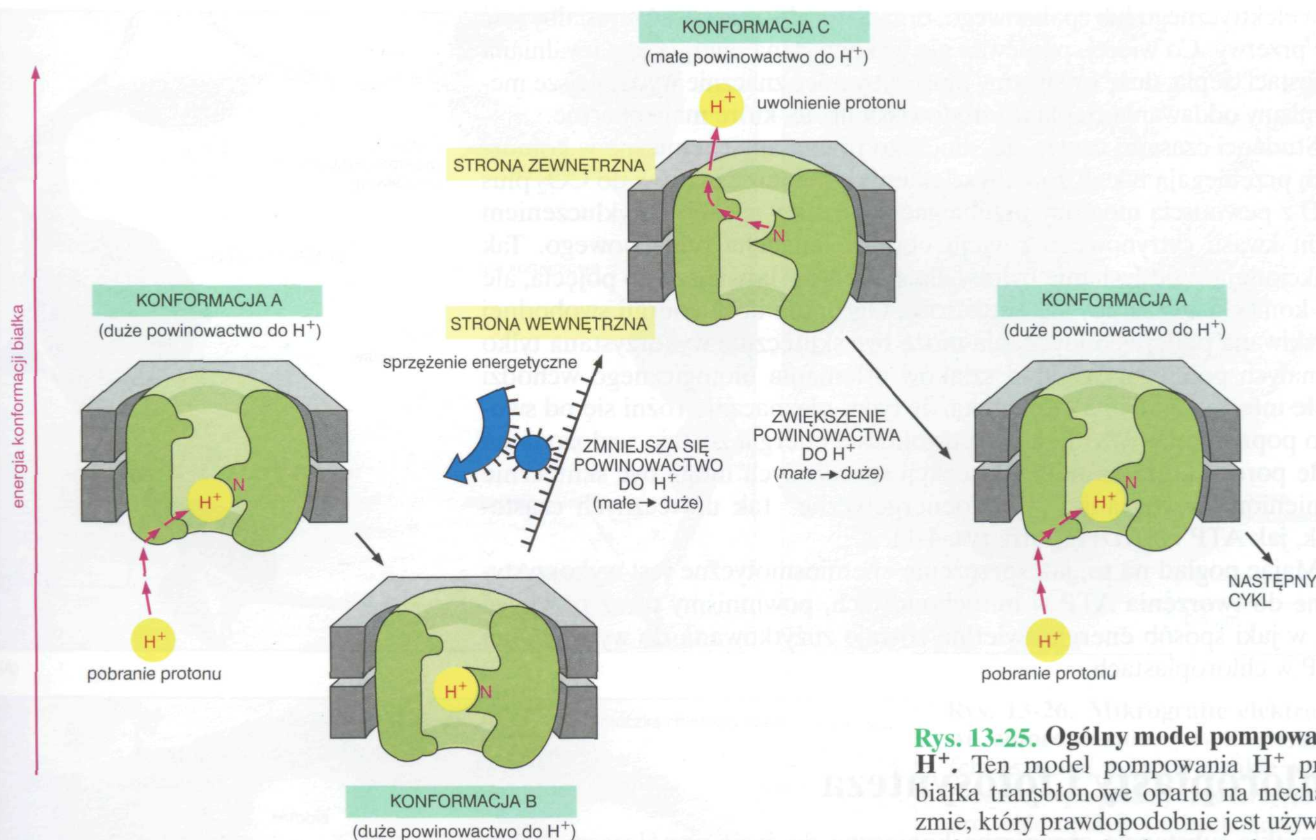
Protony są pompowane w poprzek błony przez trzy kompleksy enzymów oddechowych

Wykazano doświadczalnie, że H^+ są pompowane w poprzek błony wtedy, gdy elektrony przechodzą przez każdy z trzech kompleksów enzymów oddechowych (patrz rys. 13-10). Każdy kompleks pompuje przeciętnie ok. dwa H^+ na elektron lub ok. pięć H^+ na sumę elektronów (10 protonów na utlenianą cząsteczkę NADH). Poznanie struktury trójwymiarowej poszczególnych kompleksów będzie konieczne, abyśmy mieli nadzieję, że zrozumiemy szczegóły mechanizmu pompowania protonów. Nadal jest bardzo trudno otrzymać białka błonowe w postaci krystalicznej, niezbędne do badań metodą dyfrakcji promieni X (patrz panel 5-5, s. 162–163). Z tego powodu do tej pory uzyskano całościową informację jedynie o strukturze **oksydazy cytochromowej**, enzymatycznego kompleksu oddechowego kończącego łańcuch. Dlatego też pompowanie protonów będziemy omawiać w odniesieniu do tego kompleksu enzymatycznego.

Oksydaza cytochromowa odbiera elektrony od cytochromu *c*, a więc utlenia go (stąd jej nazwa) i oddaje te elektrony do tlenu. Schemat przebiegu reakcji katalizowanej przez oksydazę cytochromową przedstawiono na rys. 13-24A, na podstawie trójwymiarowej struktury tego wielkiego transbłonowego kompleksu białkowego. Krótko mówiąc, do tlenu cząsteczkowego są dołączane cztery elektrony z cytochromu c i cztery protony ze środowiska wodnego w reakcji $4\,e^- + 4\,H^+ + O_2 \rightarrow 2\,H_2O$. Ponadto, podczas transportu elektronów są wypompowywane w poprzek błony jeszcze cztery dalsze protony, które wytwarzają elektrochemiczny gradient protonowy. Pompowanie protonów jest spowodowane przez allosteryczne zmiany konformacji białka, napędzane energią uzyskaną z transportu elektronów.

W miejscu aktywnym oksydazy cytochromowej występuje układ, w którym atom żelaza hemowego jest umieszczony obok ściśle związanego atomu miedzi (rys. 13-24B). W tym miejscu prawie cały tlen wdychany przez nas zostaje zużywany, służąc jako końcowa składnica elektronów oddawanych przez NADH na początku łańcucha transportu elektronów. Tlen najbardziej nadaje się do takiego celu ze względu na jego duże powino-

Pytanie 13-7. Dwa różnie dyfundujące przenośniki elektronów, ubichinon i cytochrom *c*, przerzucają elektrony między trzema białkowymi kompleksami łańcucha transportu elektronów. Czy, w zasadzie, tylko jeden dyfundujący przenośnik mógłby być wykorzystany w obu miejscach łańcucha oddechowego? Wyjaśnij swoją odpowiedź.



Rys. 13-25. Ogólny model pompowania H^+. Ten model pompowania H^+ przez białka transbłonowe oparto na mechanizmie, który prawdopodobnie jest używany zarówno przez oksydazę cytochromową, jak i przez bakteriorodopsynę, bakteryjną pompę protonową zasilaną światłem (patrz rys. 11-29). Białko jest napędzane *przez cykl trzech konformacji, zaznaczonych na tym modelu jako* A, B i C. Te konformacje mają różną energię, co wykazano rozpatrując ich ułożenie w płaszczyźnie pionowej. W konformacji A białko ma duże powinowactwo do H^+ i to powoduje wciągnięcie H^+ do wnętrza błony. W konformacji C małe powinowactwo białka do H^+ umożliwia uwolnienie H^+ po zewnętrznej stronie błony. Przejście od konformacji B do uwalniającej H^+ konformacji C jest niekorzystne energetycznie i może zachodzić tylko dlatego, że jest sprzężone z zasilającą je energetycznie korzystną reakcją przebiegającą w innym miejscu białka (*strzałka niebieska*). Pozostałe dwie zmiany konformacyjne, $A \rightarrow B$ i $C \rightarrow A$, zachodzą spontanicznie, ponieważ przechodzą one do stanu niskoenergetycznego. Cykl $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow A \rightarrow B \rightarrow C$ przechodzi więc tylko w jednym kierunku, co powoduje pompowanie H^+ z wnętrza (matriks w mitochondriach) na zewnątrz (przestrzeń międzybłonowa w mitochondriach). Oksydazie cytochromowej energię potrzebną do przejścia $B \rightarrow C$ dostarcza transport elektronów, natomiast bakteriorodopsyna korzysta z energii dostarczanej przez światło. Inne pompy protonowe czerpią energię z hydrolizy ATP (omówiono w rozdz. 12)

wactwo do elektronów. Jednak gdy jeden elektron odłączy się od O_2, powstaje rodnik ponadtlenkowy O_2^-; ten rodnik jest niebezpiecznie reaktywny i będzie chciwie wyłapywał dalsze trzy elektrony wszędzie, gdzie tylko je znajdzie. Jednym z zadań oksydazy cytochromowej jest silne przytrzymywanie „swojego" tlenu cząsteczkowego tak długo, dopóki nie zagarnie ona wszystkich czterech elektronów niezbędnych do przekształcenia tego tlenu w dwie cząsteczki H_2O, co zapobiega przypadkowemu zaatakowaniu cząsteczek w komórce przez wolne rodniki. Wynalazek, jakim jest oksydaza cytochromowa, okazał się więc przełomowy dla ewolucji komórek wykorzystujących tlen jako akceptor elektronów.

Warunkiem aktywnego pompowania protonów w poprzek błony przez białka jest sprzężenie pompy białkowej z reakcją energetycznie korzystną. W przypadku oksydazy cytochromowej taką reakcją korzystną energetycznie jest dołączenie elektronów do O_2 w miejscu aktywnym enzymu. Uważa się, że protony są przenoszone w innym miejscu oksydazy cytochromowej przez boczny łańcuch histydyny, który pod wpływem wchodzących elektronów przemieszcza się, prawdopodobnie wiążąc H^+ po stronie matriks i uwalniając go od strony przestrzeni międzybłonowej (rys. 13-25).

Oddychanie jest zdumiewająco skuteczne

Zmiany energii swobodnej towarzyszące spalaniu tłuszczów i węglowodanów bezpośrednio do CO_2 i H_2O można porównać z całkowitą ilością energii przekształcanej podczas właściwego utleniania biologicznego i magazynowanej w wiązaniach fosforanowych ATP. Po przeprowadzeniu tego porównania widać, że wydajność, z jaką energia utleniania jest przekształcana w „wysokoenergetyczne" wiązania ATP, często przekracza 40%. Jest ona znacznie większa od wydajności prawie wszystkich przekształcających energię urządzeń niebiologicznych. Gdyby komórki pracowały z wydajnością sil-

nika elektrycznego lub spalinowego, organizm, aby przetrwać, musiałby jeść bez przerwy. Co więcej, ponieważ nie wykorzystana energia jest uwalniana w postaci ciepła, duże organizmy musiałyby mieć znacznie wydajniejsze mechanizmy oddawania ciepła do środowiska niż te, które mają obecnie.

Studenci czasami dziwią się, dlaczego przemiany chemiczne w komórkach przebiegają tak złożonymi szlakami. Utlenianie cukrów do CO_2 plus H_2O z pewnością mogłoby przebiegać w prostszy sposób z wykluczeniem cyklu kwasu cytrynowego i wielu etapów łańcucha oddechowego. Tak funkcjonujące oddychanie byłoby dla studentów łatwiejsze do pojęcia, ale dla komórki okazałoby się katastrofą. Ogromna ilość energii swobodnej uzyskiwana podczas oddychania może być skutecznie wykorzystana tylko w małych porcjach. W skład szlaków utleniania biologicznego wchodzi wiele intermediatów, z których każdy tylko nieznacznie różni się od swojego poprzednika. Wskutek tego uwolniona energia zostaje rozłożona na małe porcje, które za pomocą reakcji sprzężonych mogą być skutecznie zamienione w wiązania „wysokoenergetyczne" tak użytecznych cząsteczek, jak ATP i NADH (patrz rys. 4-1).

Mając pogląd na to, jak sprzężenie chemiosmotyczne jest wykorzystywane do tworzenia ATP w mitochondriach, powinniśmy teraz przyjrzeć się, w jaki sposób energia świetlna zostaje zużytkowana do wytwarzania ATP w chloroplastach.

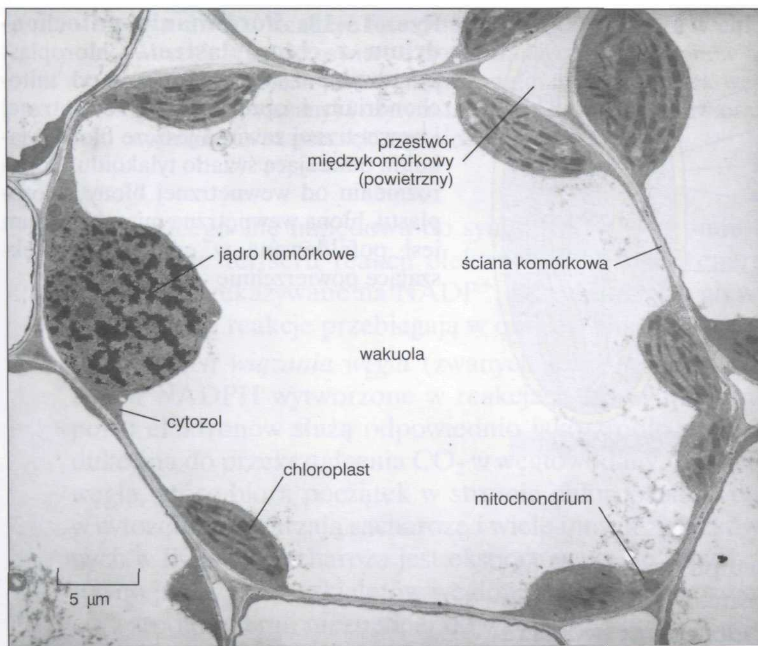
Chloroplasty i fotosynteza

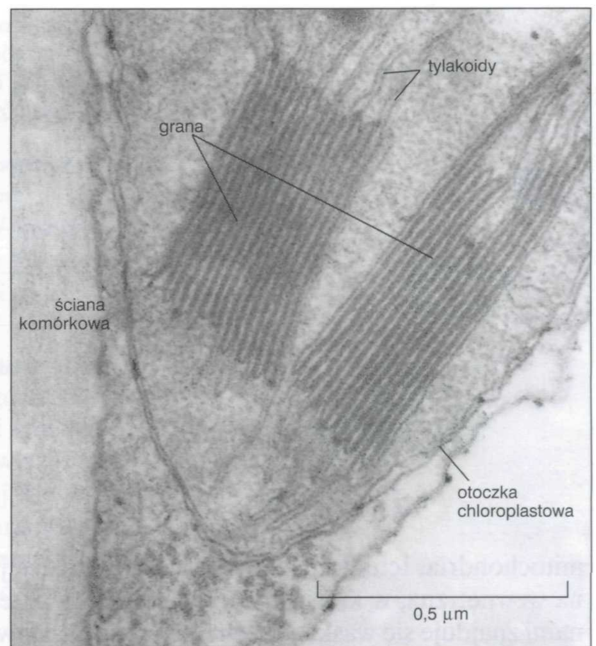
Wszystkie substancje organiczne konieczne do życia współczesnych komórek są produktami fotosyntezy — serii reakcji uzależnionych od światła, dzięki którym są syntetyzowane cząsteczki organiczne z atmosferycznego dwutlenku węgla (CO_2). Organizmy przeprowadzające proces **fotosyntezy** to rośliny wyższe, glony i wiele typów fotosyntetyzujących bakterii. Rośliny wyższe, glony i większość najwyżej zorganizowanych bakterii fotosyntetyzujących, takich jak *Cyanobacteria* (patrz rys. 13-1A), do przekształcenia atmosferycznego CO_2 w związki organiczne wykorzystują elektrony pochodzące z wody, a energię ze światła słonecznego. W przypadku rozkładu wody uwalniają one do atmosfery ogromne ilości tlenu. Tlen ten jest z kolei konieczny do procesów oddechowych komórki — nie tylko zwierząt, lecz także roślin i wielu bakterii.

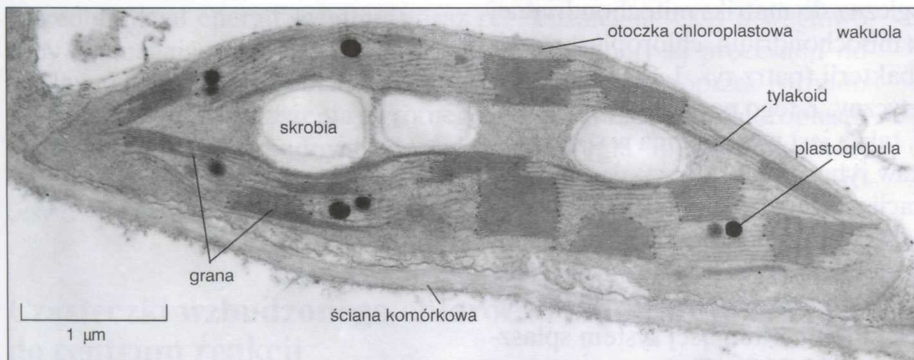
U roślin proces fotosyntezy przeprowadzają wyspecjalizowane organelle — **chloroplasty**. Na świetle chloroplasty fotosyntetyzują wytwarzając wówczas ATP i NADPH, które następnie — również wewnątrz tej organelli — są wykorzystywane do przekształcenia CO_2 w cukry. Te z kolei są eksportowane do cytozolu, gdzie służą jako źródło energii do syntezy ATP oraz jako substraty do wielu innych, koniecznych do życia komórki roślinnej, cząsteczek organicznych. Cukier jest także eksportowany do wszystkich tych komórek, które są pozbawione chloroplastów. Podobnie jak w przypadku komórek zwierzęcych, większość ATP występującego w cytozolu komórek roślinnych powstaje w mitochondriach w wyniku utleniania cukrów i tłuszczów.

Chloroplasty przypominają mitochondria, lecz mają dodatkowy przedział

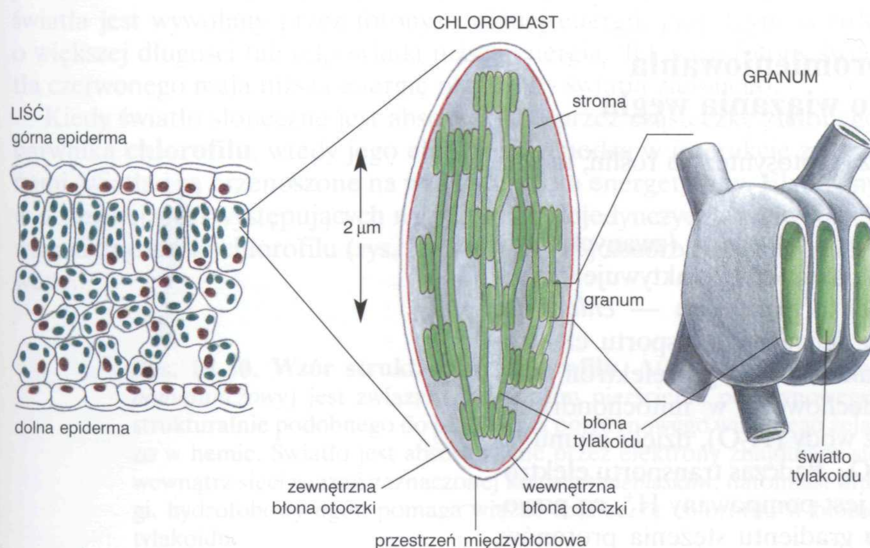
Chloroplasty, podobnie jak mitochondria, przekształcają energię wykorzystując do tego celu gradient protonów. Chociaż są one większe (rys. 13-26A), to jednak są zorganizowane według takiego samego schematu jak



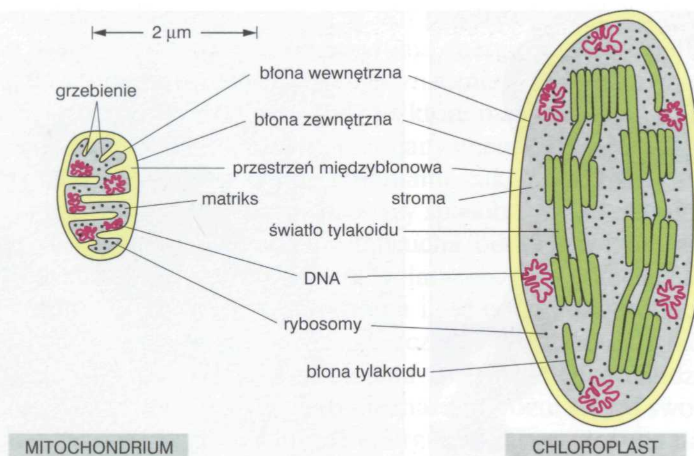




Rys. 13-26. Mikrografie elektronowe chloroplastów. (A) Komórka liścia pszenicy, w której cienkie pasmo brzeżnej cytoplazmy zawierające jądro, chloroplasty i mitochondria otacza dużą wakuolę. (B) Przekrój przez pojedynczy chloroplast ukazujący otoczkę choroplastu, ziarna skrobi oraz krople lipidowe (tłuszczowe), zwane plastoglobulami, obecne w stromie dzięki zachodzącym tam biosyntezom. (C) Większe powiększenie dwóch *gran* będących stosem tylakoidów. (Dzięki uprzejmości: K. Plaskitt)



Rys. 13-27. Chloroplast. Ta fotosyntetyzująca organella zawiera trzy odrębne błony (błonę zewnętrzną, wewnętrzną i błonę tylakoidu), które wyznaczają trzy odrębne przedziały wewnętrzne (przestrzeń międzybłonową, stromę i światło tylakoidu). Błona tylakoidu zawiera pełen komplet systemów, łącznie z ich chlorofilami, potrzebnych do wytworzenia w chloroplaście energii. Chociaż z mikrografii elektronowej wynika, że błona ta tworzy odrębne jednostki, które tworzą pojedyncze, spłaszczone pęcherzyki (patrz rys. 13-26C), to najprawdopodobniej są one połączone w chloroplaście w jeden, silnie pofałdowany tylakoidowy system błonowy. Pojedyncze tylakoidy są ze sobą połączone i wykazują tendencję do zespalania się, a tym samym tworzenia gran



Rys. 13-28. Porównanie mitochondrium z chloroplastem. Chloroplast jest zwykle znacznie większy od mitochondrium i oprócz błony zewnętrznej i wewnętrznej zawiera jeszcze błonę tylakoidu otaczającą światło tylakoidu. W odróżnieniu od wewnętrznej błony chloroplastu, błona wewnętrzna mitochondrium jest pofałdowana w grzebienie zwiększające powierzchnię

mitochondria. Ich błona zewnętrzna jest bardziej przepuszczalna niż błona wewnętrzna, w której znajdują się białka przenośnikowe. Między błonami znajduje się wąska przestrzeń międzybłonowa. Obie błony tworzą razem otoczkę chloroplastową (rys. 13-26B). Błona wewnętrzna otacza duży obszar zwany **stromą**, która jest analogiczna do matriks mitochondrialnej i zawiera wiele enzymów. Podobnie jak mitochondrium, chloroplast rozwinął się z pochłoniętej przez komórkę bakterii (patrz rys. 1-14) i nadal zawiera swój własny genom i system genetyczny. Z tego powodu stroma, analogicznie do matriks mitochondrialnej, także jest wyposażona w specyficzny dla chloroplastu: DNA, RNA i zestaw rybosomów.

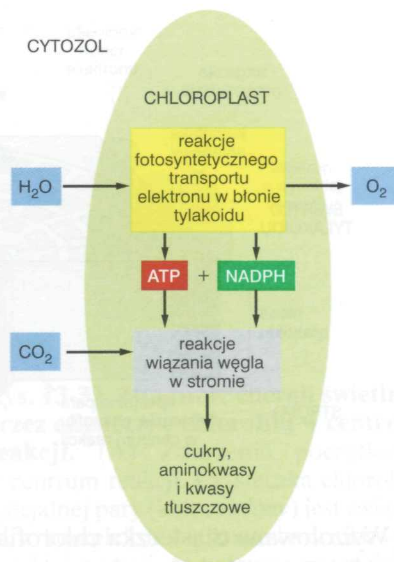
Jednakże istotną różnicą w organizacji wewnętrznej między mitochondrium a chloroplastem jest to, że błona wewnętrzna otoczki chloroplastowej nie zawiera łańcucha transportu elektronów, a systemy zbierające energię świetlną, łańcuchy transportu elektronów oraz syntaza ATP znajdują się w *błonie tylakoidowej* — trzeciej błonie budującej system spłaszczonych cystern zwanych *tylakoidami* (rys. 13-26C). Tworzą one stosy, a przestrzeń wewnątrz każdego tylakoidu jest połączona z analogicznymi przestrzeniami innych tylakoidów, dlatego jest definiowana jako trzeci, wewnętrzny przedział, oddzielony od stromy błoną tylakoidu (rys. 13-27). Strukturowe podobieństwa i różnice między mitochondriami i chloroplastami są przedstawione na rys. 13-28.

Chloroplasty zbierają energię promieniowania słonecznego i wykorzystują ją do wiązania węgla

Zbiór wielu reakcji, które zachodzą podczas fotosyntezy u roślin, można pogrupować w trzy główne kategorie.

1. W *reakcjach fotosyntetycznego transportu elektronów* (zwanych także reakcjami świetlnymi) energia światła słonecznego aktywuje (wzbudza) elektron w zielonym barwniku organicznym — *chlorofilu*, umożliwiając ruch elektronu wzdłuż łańcucha transportu elektronów w błonie tylakoidu, podobnie jak wówczas, gdy elektron przemieszcza się wzdłuż łańcucha oddechowego w mitochondriach. Chlorofil uzyskuje swoje elektrony z wody (H_2O), dzięki czemu jako produkt uboczny jest wydzielany O_2. Podczas transportu elektronu, ze stromy do wnętrza tylakoidu jest pompowany H^+, co powoduje powstanie elektrochemicznego gradientu stężenia protonów,

Rys. 13-29. Reakcje fotosyntetyczne zachodzące w chloroplaście. W reakcjach fotosyntetycznego transportu elektronów woda ulega utlenieniu, a tlen jest uwalniany, natomiast dwutlenek węgla jest asymilowany (wiązany) i użyty w reakcjach syntezy cukrów oraz różnorodnych innych cząsteczek organicznych



stanowiącego siłę napędową do syntezy ATP w stromie. W końcowym etapie tej serii reakcji elektrony o wysokiej energii (razem z H^+) są przekazywane na $NADP^+$, przekształcając go w NADPH. Wszystkie te reakcje przebiegają w obrębie chloroplastu.

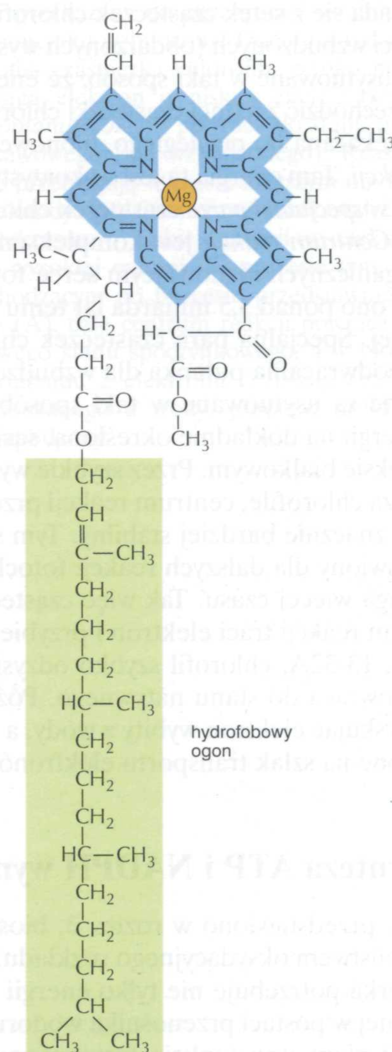
2. W *reakcjach wiązania węgla* (zwanych także reakcjami ciemnymi) ATP i NADPH wytworzone w reakcjach fotosyntetycznego transportu elektronów służą odpowiednio jako źródło energii i siła redukcyjna do przekształcenia CO_2 w węglowodany. Reakcje wiązania węgla, które biorą początek w stromie chloroplastu i dalej biegną w cytozolu, wytwarzają sacharozę i wiele innych związków organicznych w liściach. Sacharoza jest eksportowana do innych tkanek zarówno jako źródło szkieletów węglowych (związków organicznych), jak i źródło energii niezbędnej do wzrostu rośliny.

Tak więc wytwarzanie ATP, NADPH i O_2 (do czego jest konieczny bezpośredni udział energii świetlnej) oraz przekształcanie CO_2 w węglowodany (wymagające tylko pośrednio energii świetlnej) są procesami oddzielnymi (rys. 13-29), chociaż połączonymi wzajemnie poprzez rozbudowane mechanizmy sprzężenia zwrotnego. Na przykład kilka chloroplastowych enzymów niezbędnych do wiązania węgla ulega inaktywacji w ciemności, natomiast ponownie aktywują je stymulowane światłem procesy transportu elektronów.

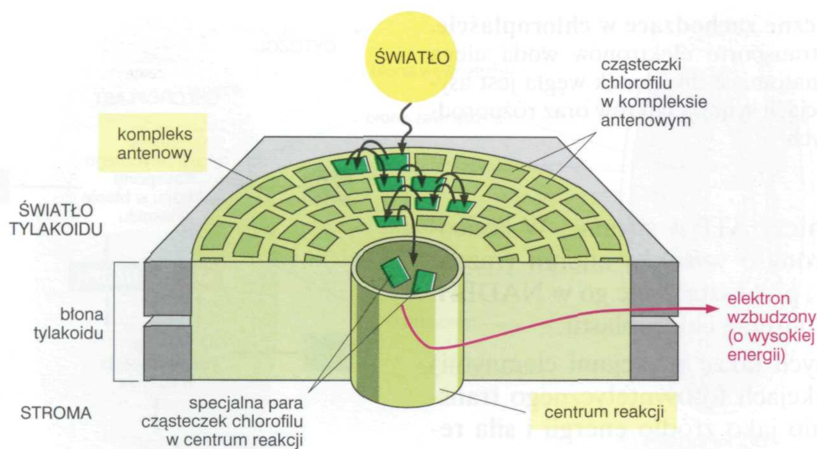
Cząsteczki wzbudzonego chlorofilu skierowują energię do centrum reakcji

Światło widzialne jest formą promieniowania elektromagnetycznego złożonego z wielu fal o różnej długości, których zakres rozciąga się od fioletu (długość fali 400 nm) do dalekiej czerwieni (700 nm). Kiedy rozpatrujemy zjawiska zachodzące na poziomie pojedynczej cząsteczki — takie jak absorpcja światła przez cząsteczkę chlorofilu, musimy traktować światło jako zbiór oddzielnych porcji energii zwanych *fotonami*. Różny kolor światła jest wywołany przez fotony o różnej energii, przy czym światłu o większej długości fali odpowiada niższa energia. Tak więc fotony światła czerwonego mają niższą energię niż fotony światła zielonego.

Kiedy światło słoneczne jest absorbowane przez cząsteczkę zielonego barwnika **chlorofilu**, wtedy jego elektrony wchodzą w interakcję z fotonami światła i są przenoszone na wyższy poziom energetyczny. Elektrony w obszernej sieci występujących na przemian pojedynczych i podwójnych wiązań cząsteczki chlorofilu (rys. 13-30) najsilniej absorbują światło czerwone.



Rys. 13-30. Wzór strukturalny chlorofilu. Atom magnezu (kolor *pomarańczowy*) jest związany w centrum pierścienia porfirynowego, strukturalnie podobnego do pierścienia porfirynowego wiążącego żelazo w hemie. Światło jest absorbowane przez elektrony znajdujące się wewnątrz sieci wiązań zaznaczonej kolorem *niebieskim*, natomiast długi, hydrofobowy ogon pomaga wiązać cząsteczkę chlorofilu w błonie tylakoidu



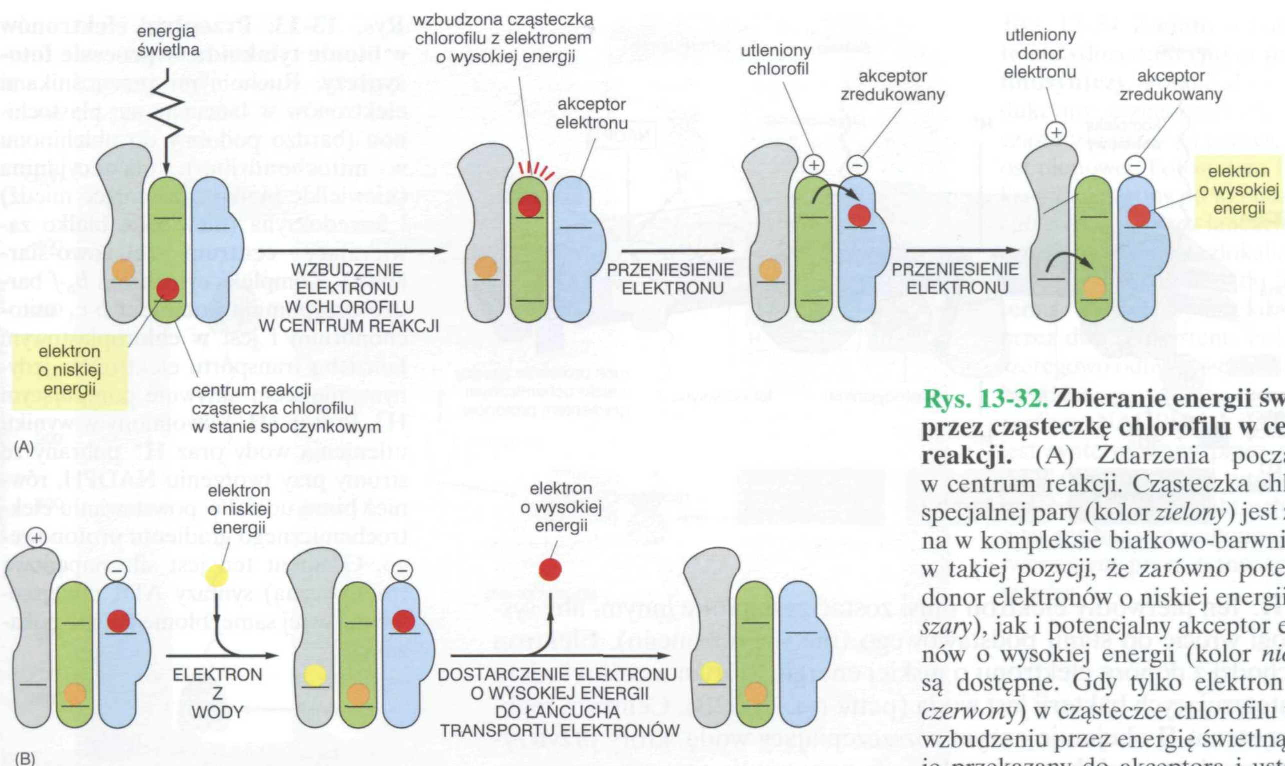
Rys. 13-31. Centrum reakcji i antena w fotosystemie. Antena zbiera wzbudzone przez światło elektrony i przekazuje ich energię na specjalną parę cząsteczek chlorofilu znajdującą się w centrum reakcji. Centrum reakcji uzyskuje tym samym elektron o wysokiej energii, który może być szybko przekazany do łańcucha transportu elektronu w błonie tylakoidu

Wyizolowana cząsteczka chlorofilu jest niezdolna do przekształcania zaadsorbowanego światła w formę energii użyteczną dla układów żywych. Jest do tego zdolna jedynie wówczas, gdy jest związana (skompleksowana) z właściwymi białkami i występuje jako integralny składnik błony. W roślinnych błonach tylakoidowych i w błonach fotosyntetyzujących bakterii, chlorofile absorbujące energię świetlną wchodzą w skład dużych i złożonych z wielu białek kompleksów zwanych **fotosystemami**. Część antenowa fotosystemu składa się z setek cząsteczek chlorofilu zbierających energię świetlną w postaci wzbudzonych (obdarzonych wysoką energią) elektronów. Chlorofile te są usytuowane w taki sposób, że energia wzbudzenia elektronowego może przechodzić z jednej cząsteczki chlorofilu na inną tak, by ostatecznie zostać przekazana do przyległego, błonowego kompleksu białkowego — *centrum reakcji*. Tam energia ta jest wykorzystywana do wzbudzenia jednego elektronu w *specjalnej parze* cząsteczek chlorofilu (rys. 13-31).

Centrum reakcji jest kompleksem transbłonowych białek i barwników organicznych stanowiącym serce fotosyntezy. Uważa się, że wykształciło się ono ponad 3,5 miliarda lat temu u prymitywnej bakterii fotosyntetyzującej. Specjalna para cząsteczek chlorofilu w centrum reakcji działa jak nieodwracalna pułapka dla wzbudzonych elektronów, ponieważ chlorofile te są usytuowane w taki sposób, aby przekazać elektron o wysokiej energii na dokładnie określoną, sąsiednią cząsteczkę w tym samym kompleksie białkowym. Przez szybkie wyprowadzenie wzbudzonego elektronu poza chlorofile, centrum reakcji przenosi go do środowiska, w którym jest on znacznie bardziej stabilny. Tym samym elektron jest dogodnie umiejscowiony dla dalszych reakcji fotochemicznych, których zakończenie wymaga więcej czasu. Tak więc cząsteczka chlorofilu znajdująca się w centrum reakcji traci elektron i przybiera ładunek dodatni. Jak pokazano na rys. 13-32A, chlorofil szybko odzyskuje elektron od przyległego donora i powraca do stanu natywnego. Później donor elektronu regeneruje się, uzyskując elektron wybity z wody, a wzbudzenie elektronowe jest przenoszone na szlak transportu elektronów (rys. 13-32B).

Synteza ATP i NADPH wymaga energii świetlnej

Jak przedstawiono w rozdz. 3, biosynteza jest w pewnym sensie przeciwieństwem oksydacyjnego rozkładu. Do produkcji swoich składników komórka potrzebuje nie tylko energii w postaci ATP, lecz także siły redukcyjnej w postaci przenośnika wodoru — NADPH (patrz rys. 3-28). Ponieważ pierwotną funkcją fotosyntezy jest synteza związków organicznych



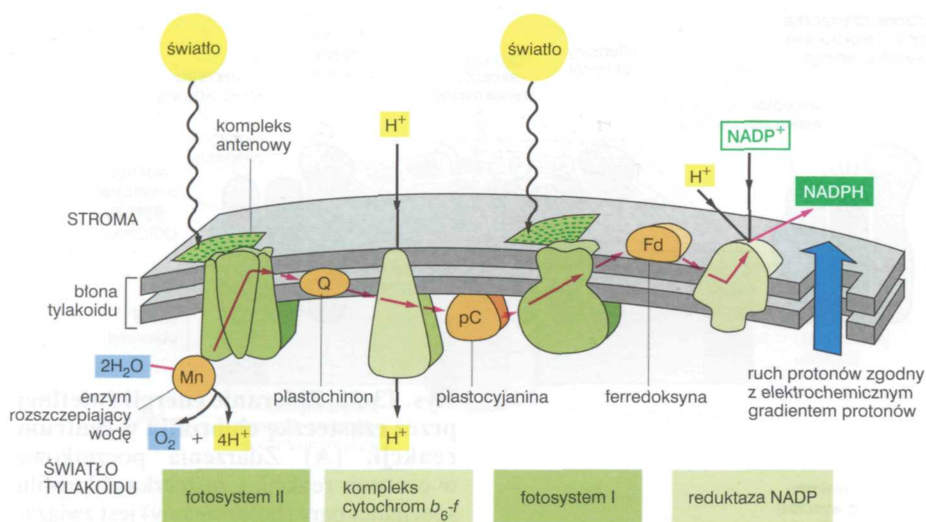
Rys. 13-32. Zbieranie energii świetlnej przez cząsteczkę chlorofilu w centrum reakcji. (A) Zdarzenia początkowe w centrum reakcji. Cząsteczka chlorofilu specjalnej pary (kolor *zielony*) jest związana w kompleksie białkowo-barwnikowym w takiej pozycji, że zarówno potencjalny donor elektronów o niskiej energii (kolor *szary*), jak i potencjalny akceptor elektronów o wysokiej energii (kolor *niebieski*) są dostępne. Gdy tylko elektron (kolor *czerwony*) w cząsteczce chlorofilu ulegnie wzbudzeniu przez energię świetlną, zostaje przekazany do akceptora i ustabilizowany jako wzbudzony. Dodatnio naładowana cząsteczka chlorofilu szybko przyciąga elektron o niskiej energii (kolor *pomarańczowy*) i powraca do stanu podstawowego (nie wzbudzonego). Reakcje te przebiegają w czasie krótszym niż 10^{-6} sekundy. (B) Ostateczne przekształcenie elektronu o niskiej energii w elektron o wysokiej energii. W procesie tym, zachodzącym po procesie przedstawionym w (A), całe centrum reakcji powraca do swego stanu spoczynkowego, a w błonie tylakoidu z elektronu o niskiej energii, uzyskanego z wody, powstaje elektron wzbudzony

z CO_2, proces ten wymaga znacznych ilości zarówno ATP, jak i siły redukcyjnej. Zapotrzebowanie na siłę redukcyjną jest pokrywane dzięki tworzeniu NADPH z $NADP^+$, z wykorzystaniem energii światła słonecznego do przekształcenia cechujących się niską energią elektronów wody w elektrony o wysokiej energii NADPH.

Fotosynteza w roślinach i sinicach prowadzi do powstania ATP i NADPH w procesie wymagającym dwóch fotonów światła. ATP jest syntetyzowany po absorpcji pierwszego fotonu, natomiast NADPH — drugiego. Dwa fotosystemy (fotoukłady) pracują w seriach. W ogólnym zarysie wygląda to następująco: energia świetlna jest najpierw absorbowana przez jeden z fotosystemów (z powodów historycznych nazwany bałamutnie *fotosystemem II*), gdzie jest wykorzystany do wytworzenia elektronu o wysokiej energii, który zostaje przeniesiony poprzez łańcuch transportu elektronów w kierunku kolejnego fotosystemu. W czasie transportu wzdłuż łańcucha elektron napędza pompę protonową w błonie tylakoidu i tworzy gradient protonowy w sposób identyczny z opisanym wcześniej przy fosforylacji oksydacyjnej (rys. 13-33). Zlokalizowana w błonie tylakoidu syntaza ATP wykorzystuje ten gradient jako siłę napędową do syntezy ATP przebiegającej w tej części błony tylakoidu, która jest skierowana do stromy.

Osiągnąwszy kolejny fotosystem na szlaku transportu (*fotosystem I*), elektron wypełnia dodatnio naładowaną „dziurę" w centrum reakcji wytworzoną na skutek wybicia elektronu przez absorpcję drugiego fotonu światła. Ponieważ fotosystem I zaczyna działać na wyższym poziomie energetycznym niż fotosystem II, również kończy działalność na wyższym poziomie i dlatego jest zdolny podnieść elektrony na bardzo wysoki poziom niezbędny do przekształcenia $NADP^+$ w NADPH (patrz rys. 13-33). Potencjały oksydoredukcyjne składników łańcucha transportu elektronów zostały podane na rys. 13-34.

W opisanym dotąd sumarycznym procesie elektron wybity z cząsteczki chlorofilu w centrum reakcji fotosystemu II zostaje przekazany do



Rys. 13-33. Przepływ elektronów w błonie tylakoidu w procesie fotosyntezy. Ruchomymi przenośnikami elektronów w łańcuchu są: plastochinon (bardzo podobny do ubichinonu w mitochondrium), plastocyjanina (niewielkie białko zawierające miedź) i ferredoksyna (niewielkie białko zawierające centrum żelazowo-siarkowe). Kompleks cytochrom b_6-f bardzo przypomina kompleks b-c_1 mitochondrium i jest w chloroplastowym łańcuchu transportu elektronów jedynym miejscem aktywnie pompującym H^+. Proton (H^+) uwolniony w wyniku utlenienia wody oraz H^+ pobrany ze stromy przy tworzeniu NADPH, również biorą udział w powstawaniu elektrochemicznego gradientu protonowego. Gradient ten jest siłą napędową (motoryczną) syntazy ATP, umiejscowionej w tej samej błonie (tu nie pokazanej)

NADPH. Ten pierwotny elektron musi zostać zastąpiony innym, aby system mógł wrócić do stanu podstawowego (nie wzbudzonego). Elektron ten pochodzi z donora elektronu o niskiej energii, którym u roślin i wielu fotosyntetyzujących bakterii jest woda (patrz rys. 13-32B). Centrum reakcji fotosystemu II obejmuje enzym rozszczepiający wodę, który przytrzymuje atomy tlenu dwóch cząsteczek wody przy grupie atomów manganu w cząsteczce białka (patrz rys. 13-33 i 13-34). W tym czasie enzym ten usuwa elektrony z wody. Służą one do wypełnienia dziury wywołanej wybiciem elektronów z cząsteczek chlorofilu centrum reakcji przez kwanty światła. Po usunięciu czterech elektronów z dwóch cząsteczek wody (do czego potrzeba czterech fotonów), O_2 ulega uwolnieniu. Proces ten, funkcjonujący przez miliardy lat, jest źródłem całego O_2 atmosfery ziemskiej.

Pytanie 13-9. Które z poniższych twierdzeń są poprawne? Uzasadnij swoje odpowiedzi.

A. Po wybiciu elektronu przez światło powinowactwo dodatnio naładowanego chlorofilu znajdującego się w centrum reakcji pierwszego fotosystemu (fotosystem II) do elektronów jest nawet większe niż powinowactwo, jakie ma do elektronów O_2.

B. Fotosynteza to zasilany światłem transport elektronu z chlorofilu do kolejnej cząsteczki o znacznie mniejszym powinowactwie do elektronu.

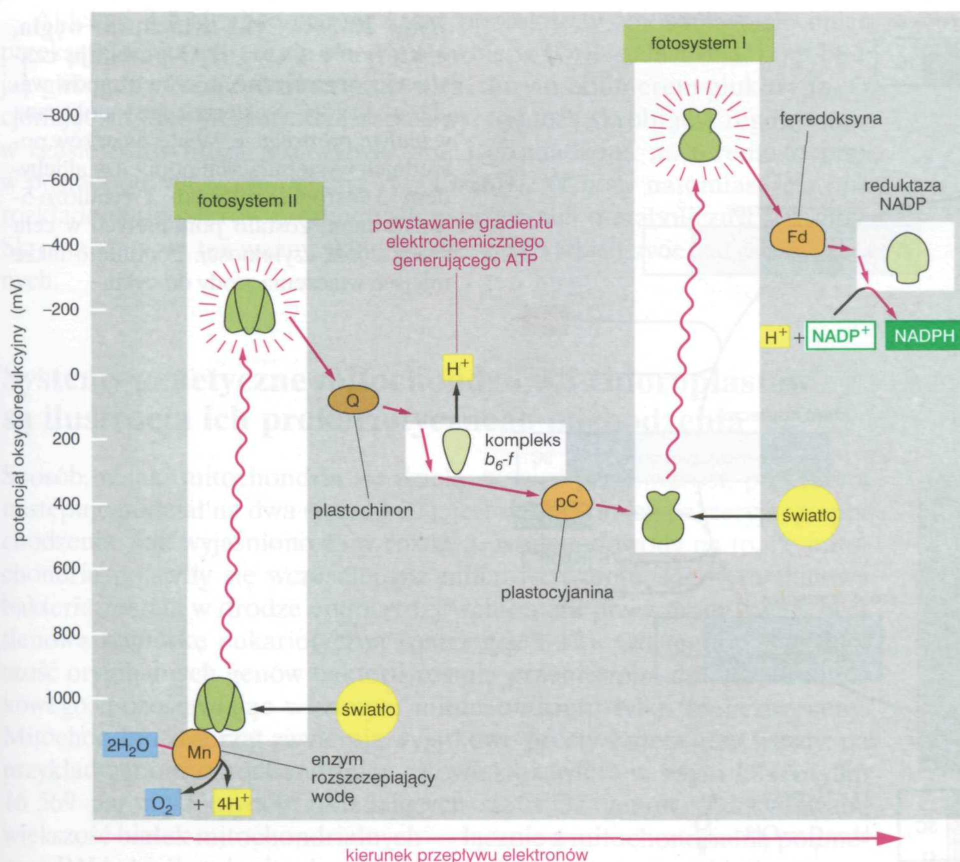
C. Ponieważ do uwolnienia jednej cząsteczki O_2 z dwóch cząsteczek H_2O potrzeba czterech fotonów, enzym rozkładający wodę musi ściśle wiązać do siebie powstające wtedy związki pośrednie, aby uniemożliwiać ucieczkę tych częściowo zredukowanych i z tego powodu niebezpiecznych rodników ponadtlenkowych.

Wiązanie węgla jest katalizowane przez karboksylazę rybulozobisfosforanową

Wiemy już, jak reakcje świetlne fotosyntezy tworzą ATP i NADPH i powinniśmy teraz rozważyć, w jaki sposób związki te są wykorzystywane w reakcjach **wiązania węgla**.

W procesie utleniania węglowodanów do CO_2 i H_2O są uwalniane znaczne ilości wolnej energii. Oczywiście reakcje odwrotne, w których z CO_2 i H_2O są syntetyzowane węglowodany, muszą w związku z tym należeć do reakcji wymagających dostarczania energii z zewnątrz. Aby więc mogły zaistnieć, jest konieczne ich sprzężenie z reakcją dostarczającą energii.

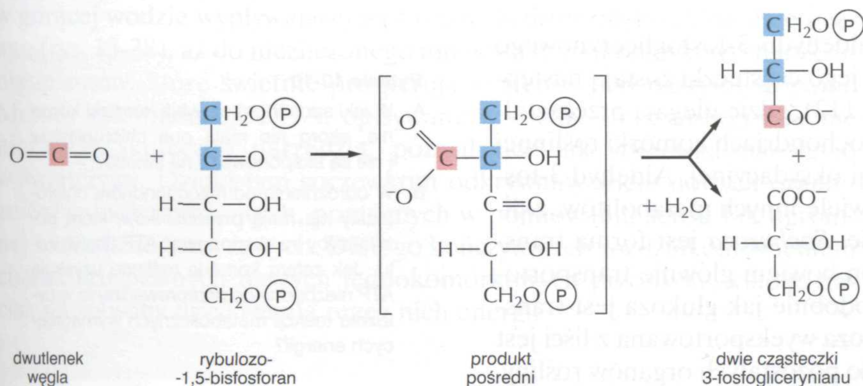
Centralną reakcję fotosyntetycznego wiązania węgla, w której atom nieorganicznego węgla (jako CO_2) zostaje przekształcony w węgiel organiczny, zilustrowano na rys. 13-35. Atmosferyczny CO_2 ulega kondensacji z pochodną pięciowęglowego cukru *rybulozo-1,5-bisfosforanem*. Powstaje sześciowęglowy związek pośredni, który po przyłączeniu cząsteczki wody rozpada się na dwie cząsteczki 3-fosfoglicerynianu. Ta reakcja, odkryta w 1948 roku, jest katalizowana w stromie chloroplastu przez duży enzym *karboksylazę rybulozobisfosforanową* (*rubisco*). Ponieważ enzym ten, w porównaniu z większością innych enzymów, należy do szczególnie wolno działających (jego aktywność katalityczna wynosi trzy cząsteczki substratu na sekundę, natomiast „typowy” enzym katalizuje w tym czasie 1000 cząsteczek), więc jest potrzebna bardzo duża liczba cząsteczek rubi-



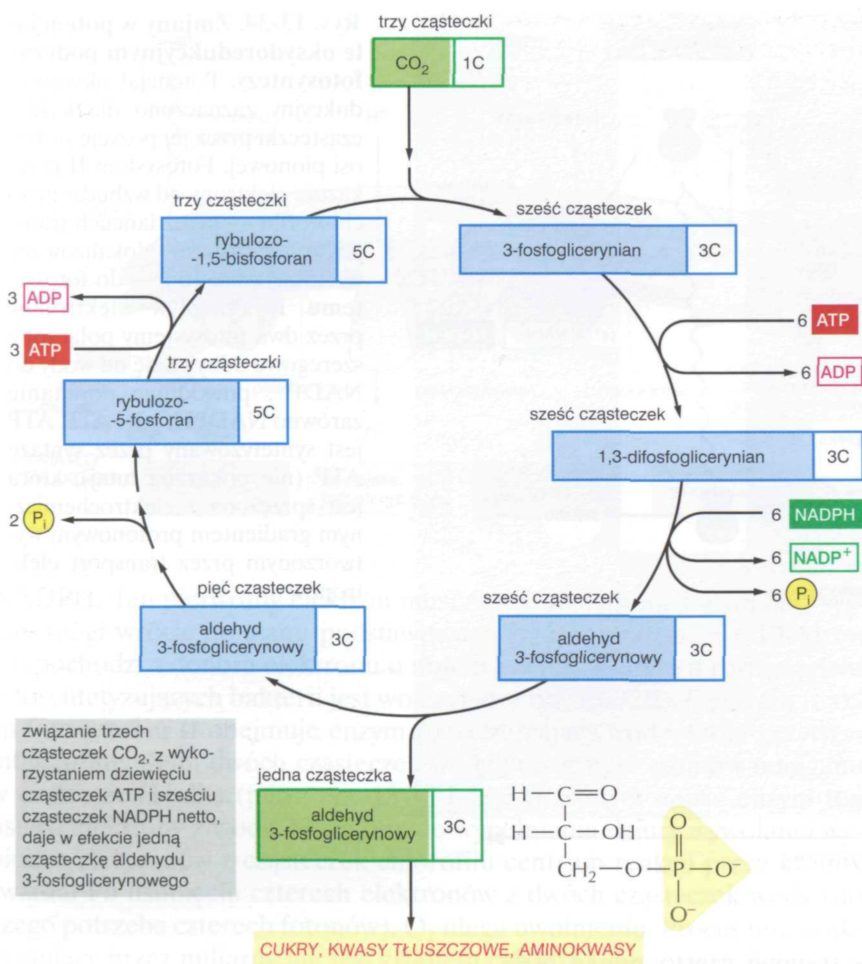
Rys. 13-34. Zmiany w potencjale oksydoredukcyjnym podczas fotosyntezy. Potencjał oksydoredukcyjny zaznaczono dla każdej cząsteczki przez jej pozycję wobec osi pionowej. Fotosystem II przekazuje elektrony od wzbudzonego chlorofilu — przez łańcuch transportu elektronów zlokalizowany w błonie tylakoidu — do fotosystemu I. Przepływ elektronów przez dwa fotosystemy połączone szeregowo odbywa się od wody do $NADP^+$, powodując powstanie zarówno NADPH, jak i ATP. ATP jest syntetyzowany przez syntazę ATP (nie pokazaną tutaj), która jest sprzężona z elektrochemicznym gradientem protonowym wytworzonym przez transport elektronów

sco. Karboksylaza rybulozobisfosforanowa stanowi często ponad 50% wszystkich białek chloroplastowych i jest powszechnie uważana za najobficiej reprezentowane białko w biosferze.

Reakcja wiązania CO_2 jest wysoce egzoergiczna, ale tylko dlatego, że w reakcji tej następuje ciągły dopływ bogatego w energię składnika — rybulozo-1,5-bisfosforanu, do którego jest przyłączana pojedyncza cząsteczka CO_2 (patrz rys. 13-35). Rozbudowany szlak metaboliczny, za pomocą którego składnik ten jest regenerowany, wymaga zarówno ATP, jak i NADPH; jego poznanie było efektem jednego z pierwszych udanych zastosowań w biochemii izotopów promieniotwórczych jako znaczników. *Cykl wiązania węgla* (inaczej cykl Calvina) w ogólnym zarysie jest pokazany na rys. 13-36; jest to cykliczny proces rozpoczynający się i kończący na rybulozo-1,5-bisfosforanie. Na każde trzy cząsteczki dwutlenku węgla wchodzące do cyklu



Rys. 13-35. Początkowa reakcja przy wiązaniu węgla. Reakcja ta, w której dwutlenek węgla jest przekształcany w węgiel organiczny, jest katalizowana w stromie chloroplastu przez obecny w dużej ilości enzym — karboksylazę rybulozobisfosforanową. Produktem reakcji jest 3-fosfoglicerynian



Rys. 13-36. Cykl wiązania węgla, w którym z CO_2 i H_2O powstają cząsteczki organiczne. Liczba atomów węgla w każdej cząsteczce jest pokazana w *białym prostokącie*. Wiele związków pośrednich występujących pomiędzy aldehydem 3-fosfoglicerolowym i rybulozo-5--fosforanem zostało pominiętych w celu zwiększenia czytelności. Pominięto także miejsce włączenia wody do cyklu

powstaje jedna nowa cząsteczka *aldehydu 3-fosfoglicerynowego* – trójwęglowego cukru stanowiącego produkt netto cyklu. Jest on następnie wykorzystywany do syntezy wielu innych cukrów i związków organicznych.

W cyklu wiązania węgla są zużywane trzy cząsteczki ATP i dwie cząsteczki NADPH na każdą cząsteczkę CO_2 przekształconą w węglowodan. Tak więc do wytworzenia cząsteczki cukru z CO_2 i H_2O są konieczne zarówno fosforan gromadzący energię w wiązaniach (w postaci ATP), jak i siła redukująca (jako NADPH).

Wiązanie węgla w chloroplastach wytwarza sacharozę i skrobię

Większość powstałego w chloroplastach aldehydu 3-fosfoglicerynowego jest transportowana do cytozolu. Niektóre jego cząsteczki zostają następnie włączone w szlak glikolityczny (patrz s. 112), gdzie ulegają przekształceniu w pirogronian wykorzystywany w mitochondriach komórki roślinnej do wytwarzania ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Aldehyd 3-fosfoglicerynowy jest także przekształcany w wiele innych metabolitów, z disacharydem, jakim jest sacharoza, włącznie. *Sacharoza* jest formą transportową cukrowca. W takiej postaci jest on bowiem głównie transportowany pomiędzy komórkami roślinnymi, podobnie jak glukoza jest transportowana wraz z krwią u zwierząt. Sacharoza wyeksportowana z liści jest dostarczana poprzez wiązki przewodzące do pozostałych organów rośliny.

Pytanie 13-10

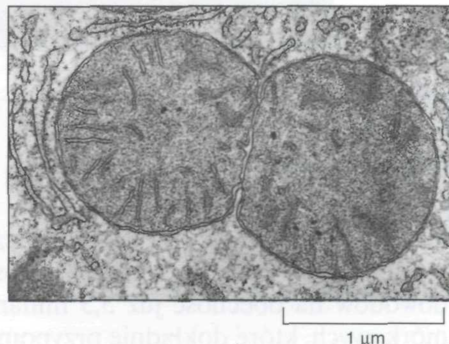
A. W jaki sposób przeżywają komórki korzenia, skoro nie mają one chloroplastów i nie są eksponowane na światło?

B. W odróżnieniu od mitochondriów, chloroplasty nie mają przenośników, które pozwalałyby im eksportować ATP do cytozolu. Jak zatem komórki roślinne uzyskują ATP niezbędny do przeprowadzania w cytozolu reakcji metabolicznych wymagających energii?

Aldehyd 3-fosfoglicerynowy, który pozostaje w chloroplastach, ulega przekształceniu na terenie stromy głównie w *skrobię*. Jest ona, podobnie jak glikogen w komórkach zwierzęcych, dużym polimerem glukozy funkcjonującym jako węglowodan zapasowy. Synteza skrobi jest regulowana; w czasie fotosyntezy jest wytwarzana i gromadzona na terenie stromy w postaci dużych ziaren (patrz rys. 13-26B). W nocy natomiast jest ona rozkładana do cukrów niezbędnych w procesach metabolicznych rośliny. Skrobia stanowi też ważny składnik diety wszystkich zwierząt roślinożernych.

Systemy genetyczne mitochondriów i chloroplastów są ilustracją ich prokariotycznego pochodzenia

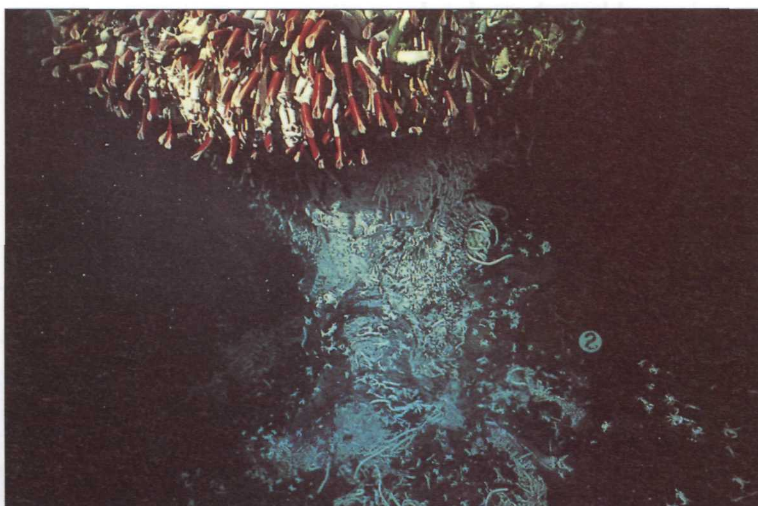
Sposób, w jaki mitochondria się dzielą, w więc przez wzrost, po którym następuje podział na dwa (rys. 13-37), jest dowodem ich bakteryjnego pochodzenia. Jak wyjaśniono to w rozdz. 1, istnieją dowody na to, że mitochondria pojawiły się wcześniej niż miliard lat temu, kiedy to tlenowa bakteria została w drodze endocytozy wchłonięta przez prymitywną, beztlenową komórkę eukariotyczną (patrz rys. 1-12). Od tego czasu większość oryginalnych genów bakterii została przeniesiona do jądra komórkowego, pozostawiając w samym mitochondrium tylko nieliczne geny. Mitochondria zwierząt zawierają wyjątkowo prosty system genetyczny: na przykład genom mitochondrialny człowieka zawiera w swym DNA tylko 16 569 par nukleotydów układających się w 37 genów. Zdecydowana większość białek mitochondrialnych — łącznie z mitochondrialną polimerazą RNA, białkami mitochondrialnych rybosomów i wszystkimi enzymami cyklu kwasu cytrynowego — powstaje w cytoplazmie pod kontrolą genów jądrowych; dlatego też białka te muszą być z cytoplazmy importowane do mitochondriów (co omówiono w rozdz. 14).



Rys. 13-37. Mikrografia elektronowa dzielącego się mitochondrium. (Dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)

Również chloroplasty powstały z bakterii wchłoniętej w drodze endocytozy, w tym przypadku bakterii fosfosyntetyzującej, która pobiera swoje elektrony z wody tworząc O_2 jako produkt dla niej zbędny (patrz rys. 1-14). Jako dowód takiego pochodzenia chloroplast zawiera zarówno wiele swoich własnych genów, jak i całkowity aparat transkrypcji i translacji potrzebny do wytworzenia białek kodowanych przez te geny. Genomy chloroplastowe są znacznie większe niż mitochondrialne, a geny chloroplastu są uderzająco podobne do genów cyjanobakterii, z których — jak uważamy — chloroplasty pochodzą. Niemniej jednak, podobnie jak białka mitochondrialne, liczne białka chloroplastowe są obecnie kodowane przez geny jądrowe i muszą być importowane z cytozolu.

Ziemię zamieszkują miliony różnego rodzaju organizmów. Gdziekolwiek nie spojrzeć, tam istnieje życie. Większości tych organizmów nie oglądamy — począwszy od licznych form żywych rozwijających się dobrze w gorącej wodzie wypływającej z otworów hydrotermalnych na dnie oceanu (rys. 13-38), aż do niezliczonego mnóstwa jednokomórkowych mikroorganizmów, które świetnie prosperują w glebie, pod naszymi stopami. Metody rekombinacji DNA, opisywane w rozdz. 10, stanowią obecnie niezwykle skuteczne narzędzia, pozwalające jak soczewka na wgląd w świat żywy. Dzięki tym soczewkom odkrywamy wiele nowych organizmów jednokomórkowych, pomocnych w pojmowaniu sensu tak ogromnej rozmaitości istot żywych. Dlatego kończymy ten rozdział omówieniem charakteru pewnych naszych jednokomórkowych przodków, kładąc nacisk na sposoby uzyskiwania przez nich energii.



Rys. 13-38. Niektóre organizmy żyją na dnie oceanu w pobliżu otworów hydrotermalnych. Te organizmy nie były znane, dopóki nie pojawiły się podwodne statki głębinowe docierające do tych miejsc. (Dzięki uprzejmości: Woods Hole Oceanographic Institution)

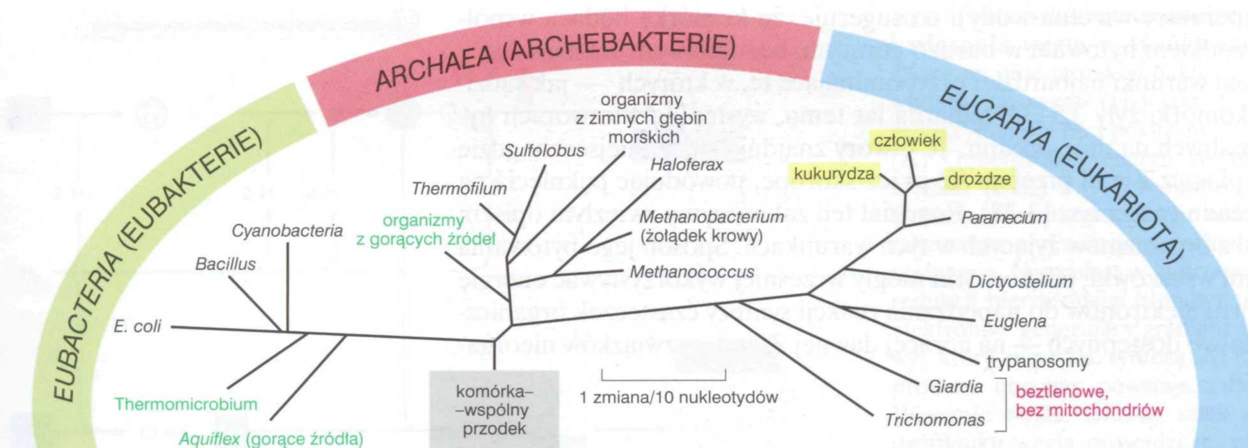
Nasi jednokomórkowi antenaci

Historię Ziemi, tak jak ją współcześnie pojmujemy, przedstawiono w ogólnym zarysie na rys. 13-2. Mikroskamieniałości dostarczyły mocnych dowodów na obecność już 3,5 miliarda lat temu organizmów jednokomórkowych, które dokładnie przypominały dzisiejsze prokarioty. Ale skamieliny nie mogą nam wiele powiedzieć o chemii prastarych komórek przede wszystkim dlatego, że wiemy, iż powierzchowne podobieństwo wielu prokariotów nie dużo mówi o ich ogromnej biochemicznej różnorodności. Zamiast tego, najlepsze ślady, jakimi dysponujemy, by zrozumiale odtworzyć historię życia, znajdują się wewnątrz współczesnych komórek w postaci wielu cząsteczek, z których są one zbudowane. Podobnie jak odcisk palca pozostawiony na miejscu zbrodni, tak te cząsteczki dostarczają nam silnych dowodów, pozwalających na odtworzenie historii bardzo dawnych wydarzeń.

Sekwencje RNA odsłaniają historię ewolucji

Rybosomowy RNA (rRNA) wykryto we wszystkich żywych komórkach. Porównanie sekwencji nukleotydów rRNA w różnych organizmach można wykorzystać do śledzenia ewolucyjnego pokrewieństwa organizmów na przestrzeni czasu. Wyznaczone w ten sposób pokrewieństwo między organizmami przedstawiamy w postaci *drzewa filogenetycznego*, w którym całkowita długość linii łączącej dwa organizmy jest proporcjonalna do liczby różnic w sekwencji nukleotydów ich rRNA; im więcej różnic, tym dłuższa linia i bardziej odległe pokrewieństwo. Na rysunku 13-39 pokazano skonstruowane z sekwencji rRNA drzewo filogenetyczne, które wskazuje pozycję kilku organizmów wybranych z całego zbioru istot żywych. Zgodność tego drzewa z innymi danymi biochemicznymi daje nam pewność, że w ten sposób można wiarygodnie oceniać ewolucyjne pokrewieństwo organizmów.

Dane osiągalne obecnie dzięki badaniu ewolucji molekularnej znacznie wzbogaciły nasze zapatrywanie na świat żywy. Na podstawie danych uzyskanych zarówno z biologii komórki, jak i badań molekularnych, świat żywy można sklasyfikować jako trzy Cesarstwa (Nadkrólestwa); dwa z nich, duże i bardzo zróżnicowane to Cesarstwo prokariotów, *Archaea* i *Bacteria*, a trzecie to Cesarstwo eukariotów, *Eucaria*. Odkrywamy, że or-



Rys. 13-39. Drzewo filogenetyczne wyprowadzone z sekwencji rybosomowego rRNA. Pokazuje ono pokrewieństwo niektórych organizmów wybranych z trzech zaproponowanych Cesarstw żywych organizmów: *Bacteria*, *Archaea* i *Eucarya*

ganizmy znane nam najlepiej — zwierzęta, rośliny i grzyby — zajmują w świecie istot żywych tylko jeden mały kącik (patrz miejsca zaznaczone kolorem *żółtym* na rys. 13-39).

Badania molekularne mówią nam również, że każde z tych trzech Cesarstw żywych organizmów jest bardzo stare; w szczególności rodowód eukariotów jest znacznie starszy, niż uprzednio sądzono. Długość linii łączącej na diagramie drzewa filogenetycznego *Eucaria* ze wspólnym przodkiem *Archaea* i *Bacteria* sugeruje, że rodowód eukariotów sięga wstecz ponad 3 miliardy lat. Przypuszczamy, że przez ogromną większość tego czasu eukarioty były organizmami jednokomórkowymi, które żyjąc beztlenowo czerpały całą energię ze szlaków fermentacyjnych. Zgodnie z tą ideą *Giardia* i *Trichomonas* nie mają mitochondriów (patrz rys. 13-29 i 1-28). Dopiero po ich symbiotycznym połączeniu z bakteriami, które stały się mitochondriami (albo chloroplastami w przypadku sinic i roślin), komórki eukariotyczne wkroczyły na zdumiewającą drogę ewolucji, prowadzącą ostatecznie do złożonych organizmów wielokomórkowych.

Przodkowie komórek prawdopodobnie pojawili się w gorących środowiskach

Powszechne zastosowanie do badania organizmów technik rekombinacji DNA wywołało zaskoczenie uświadamiając nam, że świat zapełnia o wiele więcej organizmów jednokomórkowych, niż kiedykolwiek przypuszczaliśmy. Stosując techniki takie jak klonowanie DNA czy analiza PCR (patrz rozdz. 10), można scharakteryzować wszystkie różnorodne organizmy żyjące w specyficznych środowiskach, na przykład w gorących źródłach siarkowych lub w glebie. W przeciwieństwie do standardowych technik mikrobiologicznych, za pomocą których wykrywa się jedynie te mikroby, które mogą utrzymać się przy życiu i rozmnażać w kulturach laboratoryjnych, badania rekombinacji DNA mówią nam, że do niedawna można było wykryć jedynie mniej niż jeden gatunek mikrobów na sto. Obliczono, że już tylko wierzchnie 15 cm gleby zawiera kilka ton jednokomórkowych mikroorganizmów na pół hektara. Dlatego jest oczywiste, że pozostała do odkrycia olbrzymia ilość rozmaitych nowych gatunków mikrobów, a do chwili obecnej poznaliśmy jedynie drobną część całego żywego świata.

Gatunki blisko spokrewnione z komórką kandydującą do roli wspólnego przodka trzech Cesarstw wyróżnione na rys. 13-39 *zielonymi literami*, należą zarówno do *Archaea*, jak i *Bacteria*. Organizmy te mają wspólną cechę — żyją w wysokich temperaturach (75 do 95°C, a więc zbliżonych

do temperatury wrzenia wody), co sugeruje, że komórka będąca wspólnym przodkiem bytowała w bardzo gorącym, beztlenowym środowisku.

Dzisiaj warunki najbardziej przypominające te, w których — jak sądzimy — komórki żyły 3,5–3,8 miliarda lat temu, występują w otworach hydrotermalnych na dnie oceanu. Te otwory znajdują się w miejscach, gdzie płynny płaszcz Ziemi przebija się przez skorupę, powodując pęknięcia na dnie oceanu (patrz rys. 13-38). Rozdział ten zakończymy zwięzłym opisem jednego z organizmów żyjących w tych warunkach. Sposób jego bytowania daje nam wskazówki, jak komórki mogły wcześniej wykorzystywać energię transportu elektronów do napędzania reakcji syntezy cząsteczek organicznych z łatwo dostępnych — na gorącej dawnej Ziemi — związków nieorganicznych.

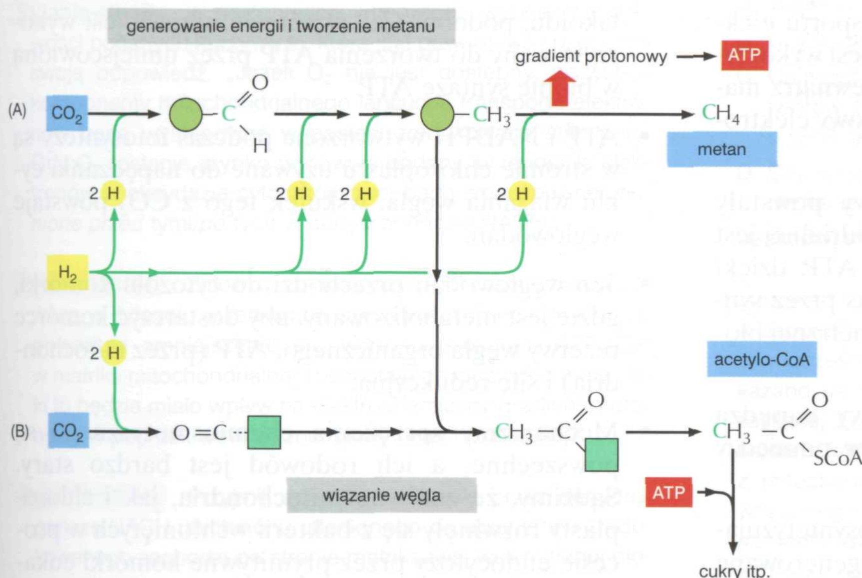
Methanococcus żyje w ciemności, używając jako pożywienia tylko związków nieorganicznych

Genom ludzki, zbiór DNA we wszystkich naszych chromosomach, zawiera $3 \cdot 10^9$ par nukleotydów. Realizacja dużego międzynarodowego projektu, którego celem jest całkowite rozpoznanie sekwencji DNA człowieka przebiega pomyślnie, a przewidywaną datą zakończenia jest 2005 rok. Ale technologia rozwijana na użytek tego projektu umożliwia osiągnięcie znacznie łatwiejszego celu, jakim jest sekwencjonowanie całego genomu wielu mniej skomplikowanych „organizmów modelowych”, z którymi nasze własne sekwencje DNA można porównywać. Jak dotąd, otrzymano całkowitą sekwencję genomu jednego eukariota, drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, których genom, zbudowany z 12 milionów par nukleotydów, jest 250 razy mniejszy od naszego (patrz rys. 10-6).

Genom drożdży zawiera od 6000 do 7000 genów, a nasz 60000. Kilka genomów prokariotycznych zsekwencjonowano całkowicie. Są to genomy znanych prostych komórek, zarówno drobniutkiej bakterii *Mycoplasma genitalium* mającej tylko ok. 500 genów, jak i genom *Methanococcus jannaschii*. *Methanococcus* zawiera ok. 1800 genów i był on pierwotnie izolowany z otworów hydrotermalnych, występujących na dnie oceanu na głębokości ponad 1600 m.

Methanococcus jest przedstawicielem *Archaea*, żyjącym w wysokich temperaturach. Rośnie on wyłącznie na pożywce nieorganicznej w całkowitym braku światła i tlenu gazowego, wykorzystując wodór w postaci gazu (H_2), CO_2 i azot gazowy (N_2), którego pęcherzyki wydzielają się z otworu hydrotermalnego. *Methanococcus* redukuje N_2 do amoniaku (NH_3) przez dołączenie wodoru, co umożliwia wbudowanie azotu do cząsteczek organicznych. Taki proces **wiązania azotu** wymaga dużej ilości energii, tak samo jak procesy wiązania węgla, potrzebne bakterii do przekształcania CO_2 w cukry. Większość energii potrzebnej do obu procesów dostarcza transport elektronów z H_2 do CO_2, przy czym uwalnia się duża ilość metanu jako produktu ubocznego (w ten sposób bakteria wytwarza naturalny gaz, od którego pochodzi jej nazwa). Część transportu elektronów zachodzi w błonie bakterii i napędza wypompowywanie protonów (H^+) z komórki. W wyniku tego elektrochemiczny gradient protonowy zasila syntezę ATP prowadzoną przez syntazę ATP, zlokalizowaną w tej samej błonie (rys. 13-40A). Wykrycie chemiosmotycznego sprzężenia w takim organizmie jak *Methanococcus* sugeruje, że magazynowanie energii pochodzącej z transportu elektronów w gradiencie H^+ jest niezwykle starym procesem.

Mechanizm, za którego pomocą *Methanococcus* wiąże węgiel, jest zupełnie inny, niż omówiony uprzednio szlak wiązania węgla u roślin i sinic



Rys. 13-40. Szlaki generowania energii i wiązania węgla w *Methanococcus*. Te żyjące na dnie morskim bakterie używają wodoru gazowego (H_2) jako źródła siły redukcyjnej dla obu pokazanych szlaków. (A) Generowanie energii. Wytwarzanie metanu (CH_4) z CO_2 zachodzi na kilku etapach. Początkowe reakcje redukcji katalizowane przez enzymy zachodzą w cytoplazmie. Natomiast w końcowej reakcji redukcji bierze udział błonowy transport elektronów generujący gradient protonowy, który napędza syntezę ATP, a jako produkt uboczny powstaje metan. (B) Wiązanie węgla. Główny szlak wiązania dwutlenku węgla prowadzi do produkcji acetylo-CoA. Jest on źródłem cukrów, kwasów tłuszczowych i nukleotydów potrzebnych komórce do biosyntez. *Zielone kółka* i *kwadraty* w diagramie przedstawiają szereg koenzymów, które wiążą wskazane intermediaty metaboliczne

(*Cyanobacteria*). Jak pokazano na rys. 13-40B, wodór gazowy (H_2), poza tym że stanowi źródło elektronów dla procesów błonowych wytwarzających ATP, jest także wykorzystywany do redukcji CO_2 i przekształcania go w związaną z enzymem cząsteczkę tlenku węgla (CO). Z kolei CO reaguje z grupą metylową, wytwarzaną w procesie metanogenezy jako intermediat, aby utworzyć acetylo-CoA. Następnie acetylo-CoA zostaje przekształcany w cukry, aminokwasy, nukleotydy i wiele innych małych i dużych cząsteczek, w szlaku metabolicznym katalizowanym przez enzymy, wszystkie wymagające ATP.

Methanococcus nie jest bynajmniej prostym organizmem; na przykład spośród jego 1800 genów ponad 60 koduje enzymy, które funkcjonują tylko w samym szlaku od CO_2 do CH_4. Wcześniejsze komórki zawierające białka musiały być dużo prostsze; wydaje się, że wystarczało im w sumie mniej niż 100 genów. Dużo większe możliwości jako narzędzie do rekonstrukcji przeszłości daje nam sekwencjonowanie znacznie większych genomów rozmaitych organizmów jednokomórkowych. Jednakże główne wyzwania poznawcze w tym zakresie pozostają nadal przed nami. Na przykład, obecnie nie możemy w przekonujący sposób wyjaśnić, jak komórki zawierające tylko RNA, które — jak zakładamy — pojawiły się w toku ewolucji komórkowej bardzo wcześnie (patrz rys. 7-39), mogły rozwijać umiejętność wykorzystywania dostarczających energię procesów fermentacji czy transportu elektronów związanego z błonami, a więc mechanizmów zasilających wszystkie komórki poznane do dnia dzisiejszego.

Streszczenie

- Mitochondria, chloroplasty i liczne typy bakterii wytwarzają ATP dzięki działającemu w błonie mechanizmowi sprzężenia chemiosmotycznego.
- W komórkach zwierzęcych większość ATP wytwarzają mitochondria wykorzystujące energię pochodzącą z utleniania cukrów i kwasów tłuszczowych.
- Mitochondria są otoczone dwoma koncentrycznymi błonami, z których ta położona głębiej — wewnętrzna — otacza matriks mitochondrialną. Przestrzeń wypełniona matriks zawiera wiele enzymów, włącznie z enzymami cyklu kwasu cytrynowego. Podczas utleniania acetylo-CoA enzymy te wytwarzają dużą ilość NADH i $FADH_2$.
- W wewnętrznej błonie mitochondrialnej elektrony o wysokiej energii dostarczane przez NADH i $FADH_2$ przechodzą wzdłuż łańcucha transportu elektronów (łańcucha oddechowego) i w końcu łączą się z tlenem cząsteczkowym (O_2) w reakcji korzystnej energetycznie.

- Część energii uwolnionej podczas transportu elektronów wzdłuż łańcucha oddechowego jest wykorzystywana do wypompowywania H^+ na zewnątrz matriks, wskutek czego powstaje transbłonowy elektrochemiczny gradient protonowy (H^+).
- Elektrochemiczny gradient protonowy powstały w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej jest z kolei wykorzystywany do tworzenia ATP, dzięki przepływowi H^+ z powrotem do matriks przez syntazę ATP, enzym umiejscowiony w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.
- Elektrochemiczny gradient protonowy napędza również aktywny transport metabolitów pomiędzy matriks mitochondrialną a cytoplazmą.
- W chloroplastach i w bakteriach fotosyntetyzujących elektrony o wysokiej energii są generowane podczas fotosyntezy, gdy światło słoneczne jest absorbowane przez chlorofil; energię tę przechwytują umiejscowione w tylakoidalnych błonach chloroplastów kompleksy białkowe, nazwane fotosystemami.
- Gradient protonowy utworzony w poprzek błony tylakoidu, podobnie jak w mitochondriach jest wykorzystywany do tworzenia ATP przez umiejscowioną w błonie syntazę ATP.
- ATP i NADPH wytworzone podczas fotosyntezy są w stromie chloroplastu używane do napędzania cyklu wiązania węgla, wskutek tego z CO_2 powstaje węglowodan.
- Ten węglowodan przechodzi do cytozolu komórki, gdzie jest metabolizowany, aby dostarczyć komórce rezerwy węgla organicznego, ATP (przez mitochondria) i siłę redukcyjną.
- Mechanizmy sprzężenia chemiosmotycznego są powszechne, a ich rodowód jest bardzo stary. Sądzimy, że zarówno mitochondria, jak i chloroplasty rozwinęły się z bakterii wchłoniętych w procesie endocytozy przez prymitywne komórki eukariotyczne.
- Bakterie żyjące w środowiskach podobnych, jak sądzimy, do istniejących wcześniej na Ziemi, do wytwarzania ATP również używają sprzężenia chemiosmotycznego.

Hasła

centrum żelazo-siarkowe
chinon
chlorofil
chloroplast
cytochrom
fosforylacja oksydacyjna
fotosynteza
fotosystem
łańcuch transportu elektronów
matriks
mitochondrium
oksydaza cytochromowa
para redoks
potencjał redoks
sprzężenie chemiosmotyczne
stroma
syntaza ATP
wiązanie azotu
wiązanie węgla

Pytania

Pytanie 13-11. Które z następujących wypowiedzi są poprawne? Wyjaśnij swoją odpowiedź.

A. Jony metali biorą udział w wielu, ale nie we wszystkich reakcjach przenoszenia elektronów.

B. Łańcuch transportu elektronów powoduje powstanie potencjału elektrycznego w poprzek błony, ponieważ przemieszcza on elektrony z przestrzeni międzybłonowej do matriks.

C. Elektrochemiczny gradient protonowy zawiera dwa składniki: różnicę pH i potencjał elektryczny.

D. Ubichinon i cytochrom *c* są dyfundującymi przenośnikami elektronów.

E. Ponieważ rośliny mają chloroplasty, mogą żyć bez mitochondriów.

F. Chlorofil i hem mają rozległy system wiązań podwójnych, który pozwala im na absorpcję światła widzialnego.

G. Rola chlorofilu w fotosyntezie jest równoważna z rolą hemu w mitochondrialnym transporcie elektronów.

H. Większość suchej masy drzewa dostarczają minerały pobierane przez korzenie.

Pytanie 13-12. Pojedynczy proton przemieszczający się wraz ze spadkiem gradientu elektrochemicznego do matriks mitochondrialnej, uwalnia 19,2 kJ/mol energii swobodnej. Ile protonów przepływa w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej podczas syntezy jednej cząsteczki ATP, jeżeli wartość ΔG syntezy ATP w warunkach wewnątrzkomórkowych wynosi między 46 a 54 kJ/mol? (ΔG omówiono w rozdz. 3 s. 89). Dlaczego dla tej ostatniej wartości podano jej rząd, a nie dokładną liczbę? W jakich warunkach właściwa będzie niższa wartość?

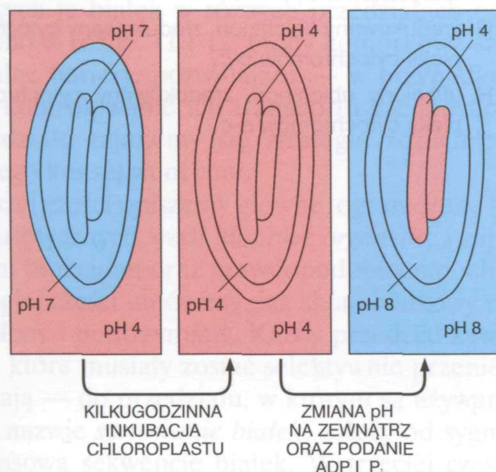
Pytanie 13-13. W następującej wypowiedzi wybierz z możliwości podanych kursywą tę, która jest prawidłowa i uzasadnij swoją odpowiedź. „Jeżeli O_2 nie jest dostępny, wszystkie komponenty mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów będą występować w postaci *zredukowanej/utlenionej*. Gdy O_2 zostanie szybko ponownie podany, przenośniki elektronów w oksydazie cytochromowej będą *zredukowane/utlenione przed* tymi/*po* tych w dehydrogenazie NADH".

Pytanie 13-14. Załóżmy, że duża ilość ATP zostaje hydrolizowana w cytozolu w reakcjach wymagających energii ATP, co powoduje zmniejszenie się wartości stosunku ATP:ADP w matriks mitochondrialnej i pozostaje on niezwykle mały. Jaki to będzie miało wpływ na elektrochemiczny gradient protonowy w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej?

Pytanie 13-15. Przyjmij, że przekształcenie przez dehydrogenazę NADH ubichinonu utlenionego do ubichinonu zredukowanego zachodzi po stronie matriksowej wewnętrznej błony mitochondrialnej i że jego utlenianie przez cytochrom *b*-c_1 zachodzi w przestrzeni międzybłonowej (patrz rys. 13-10 i 13-20). Jakie są konsekwencje takiego układu dla tworzenia gradientu H^+ w poprzek błony?

Pytanie 13-16. Jeżeli przyłoży się napięcie do dwóch platynowych drutów (elektrod) zanurzonych w wodzie, to cząsteczki wody rozszczepią się do H_2 i O_2 w postaci gazu. Przy ujemnej elektrodzie elektrony są oddawane, a H_2 gazowy uwalnia się; przy elektrodzie dodatniej elektrony są przyjmowane i tworzy się O_2 gazowy. Gdy bakteria fotosyntetyzująca albo komórka roślinna rozszczepia wodę, nie wytwarza H_2, lecz O_2. Dlaczego?

Pytanie 13-17. W bardzo poglądowym doświadczeniu, wykonanym w latach sześćdziesiątych naszego stulecia, chloroplasty najpierw przez dłuższy czas inkubowano w kwaśnym roztworze o pH 4, tak aby stroma i światło tylakoidu przybrały odczyn kwaśny (rys. P13-17). Następnie przeniesiono je do roztworu zasadowego (pH 8). Spowodowało to szybką zmianę pH stromy do 8, natomiast światło tylakoidu utrzymywało jeszcze przez pewien czas pH 4. W efekcie zaobserwowano wręcz eksplozję syntezy ATP, przy czym różnica pH pomiędzy światłem tylakoidu a stromą zanikła.



Rys. P13-17

A. Wyjaśnij, dlaczego te warunki prowadzą do syntezy ATP.

B. Czy do powodzenia eksperymentu potrzebne jest światło?

C. Co może się stać, jeśli odwróci się kolejność działania roztworów tak, że pierwsza inkubacja będzie w roztworze o pH 8, a druga w roztworze o pH 4?

D. Czy eksperyment potwierdza, czy też podaje w wątpliwość model chemiosmotyczny?

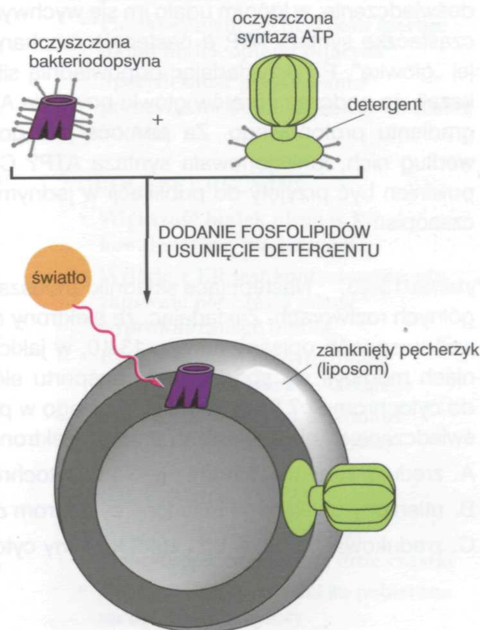
Uzasadnij swoje odpowiedzi.

Pytanie 13-18. Gdy robisz swoje pierwsze doświadczenie w laboratorium, nauczyciel prosi cię o zrekonstytuowanie równocześnie w tym samym pęcherzyku błonowym, jak pokazano na rys. P13-18, oczyszczonej bakteriorodopsyny — zasilanej światłem pompy protonowej z komórkowej błony bakterii fotosyntetyzującej — i oczyszczonej syntazy ATP z mitochondriów serca wołu. Potem masz dodać do zewnętrznego środowiska ADP i P_i, a zawiesinę pęcherzyków naświetlić światłem.

A. Co obserwujesz?

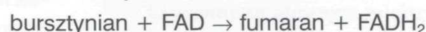
B. Co obserwujesz, jeżeli detergent nie został usunięty do końca, wskutek czego pęcherzyki błonowe są przepuszczalne dla jonów?

C. Opowiadasz przyjacielowi przy obiedzie o swoich nowych doświadczeniach, a on pyta o słuszność takiego podejścia, w którym stosuje się komponenty z tak bardzo odległych, niespokrewnionych organizmów: „Dlaczego ktoś chciałby zmieszać puding waniliowy z płynem hamulcowym?" Obroń przed jego krytyką swój sposób rozumowania.



Rys. P13-18

Pytanie 13-19. $FADH_2$ jest wytwarzany w cyklu kwasu cytrynowego przez błonowy kompleks enzymatyczny o nazwie dehydrogenaza bursztynianowa, który zawiera związany FAD i przeprowadza reakcje:



$$\text{bursztynian} + \text{FAD} \rightarrow \text{fumaran} + \text{FADH}_2$$

oraz



$$\text{FADH}_2 \rightarrow \text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2e^-$$

Jednakże potencjał redoks $FADH_2$ wynosi tylko –220 mV. Na podstawie panelu 13-1 (s. 426) i rys. 13-21 zaproponuj wiarygodny mechanizm, dzięki któremu elektrony z $FADH_2$ mogłyby przechodzić na łańcuch transportu elektronów. Narysuj diagram przedstawiający twoją propozycję działania tego mechanizmu.

Pytanie 13-20. Niektóre bakterie wyspecjalizowały się do życia w środowisku o wysokim pH (pH ~ 10). Jak sądzisz, czy te bakterie używają do produkcji ATP gradientu protonowego wytworzonego w poprzek ich błony plazmatycznej? (Wskazówka: wszystkie komórki muszą utrzymywać w cytoplazmie pH zbliżone do obojętnego).

Pytanie 13-21. Na rysunku P13-21 przedstawiono sumarycznie obwody używane przez mitochondria i chloroplasty do przekształcania form energii. Czy można prawidłowo powiedzieć, że:

A. produkty chloroplastów są substratami dla mitochondriów?

B. w chloroplastach aktywacja elektronów przez fotosystemy umożliwia zasilanie transportu elektronów z H_2O do węglowodanów, czyli w odwrotnym kierunku, niż przebiega transport elektronów w mitochondriach?

C. cykl kwasu cytrynowego jest odwróceniem prawidłowego cyklu wiązania węgla?

Pytanie 13-22. W prestiżowym czasopiśmie naukowym przedłożono do publikacji rękopis. W pracy autorzy opisują doświadczenie, w którym udało im się wychwycić pojedynczą cząsteczkę syntazy ATP, a następnie mechanicznie obracać jej „główkę", F_1, przykładając odpowiednią siłę. Autorzy wykazali, że podczas obrotów główki powstaje ATP bez udziału gradientu protonowego. Za pomocą jakiego mechanizmu, według nich, funkcjonowała syntaza ATP? Czy ten rękopis powinien być przyjęty do publikacji w jednym z najlepszych czasopism?

Pytanie 13-23. Następujące składniki zmieszałeś w poszczególnych roztworach. Zakładając, że elektrony muszą przepływać w sposób opisany na rys. 13-10, w jakich doświadczeniach mógłbyś się spodziewać transportu elektronów netto do cytochromu *c*? Przedyskutuj, dlaczego w pozostałych doświadczeniach nie zachodzi transport elektronów?

A. zredukowany ubichinon i utleniony cytochrom *c*

B. utleniony ubichinon i utleniony cytochrom *c*

C. zredukowany ubichinon i zredukowany cytochrom *c*

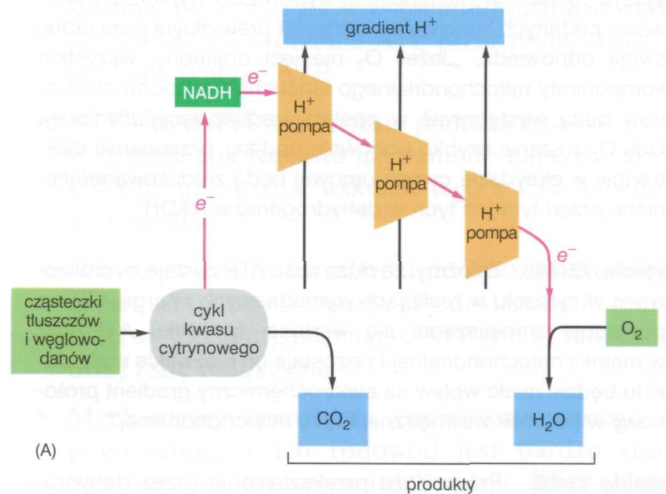
D. utleniony ubichinon i zredukowany cytochrom *c*

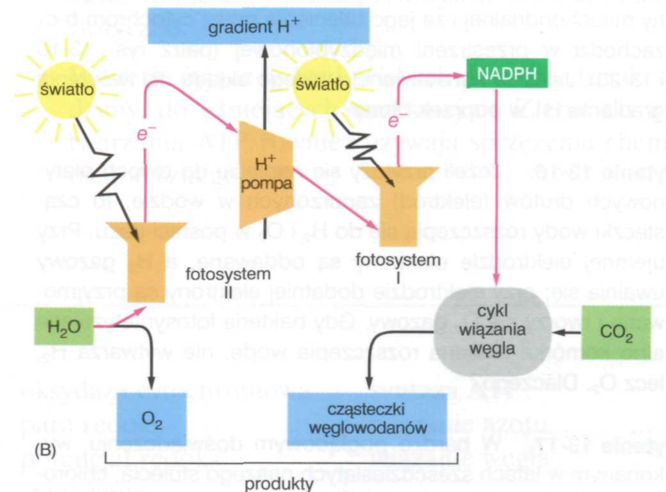
E. zredukowany ubichinon, utleniony cytochrom *c* i kompleks cytochromów *b*-c_1

F. utleniony ubichinon, utleniony cytochrom *c* i kompleks cytochromów *b*-c_1

G. zredukowany ubichinon, zredukowany cytochrom *c* i kompleks cytochromów *b*-c_1

H. utleniony ubichinon, zredukowany cytochrom *c* i kompleks cytochromów *b*-c_1





Rys. P13-21

14

Przedziały wewnątrzkomórkowe i transport

W typowej komórce eukariotycznej w każdej chwili przebiegają tysiące różnych reakcji chemicznych, z których wiele nie ma ze sobą bezpośredniego związku. Na przykład jedna seria reakcji prowadzi do wytworzenia glukozy, natomiast inny ciąg reakcji glukozę rozkłada; pewne enzymy syntetyzują wiązania peptydowe, inne natomiast hydrolizują je itd. Jeśli komórki jakiegoś organu, np. wątroby, zostaną rozdzielone i rozbite, a ich zawartość zmieszana łącznie w probówce, powstaje chemiczny chaos, a enzymy i inne białka komórki ulegają szybkiej degradacji działaniem własnych enzymów proteolitycznych. W celu zapewnienia efektywnego działania komórki, liczne, lecz różniące się od siebie procesy wewnątrzkomórkowe przebiegające równocześnie muszą być w jakiś sposób rozdzielone.

Komórki wytworzyły różne strategie segregowania i organizowania swoich reakcji chemicznych. Jedną z nich, używaną zarówno przez komórki prokariotyczne, jak i eukariotyczne, jest agregacja różnych enzymów niezbędnych do katalizowania poszczególnych ciągów reakcji w pojedynczy, wielki kompleks białek. Jak omówiono to w innych rozdziałach, takie wielobiałkowe kompleksy są używane na przykład podczas syntezy DNA, RNA i białek. Druga strategia najsilniej rozwinięta w komórkach eukariotycznych polega na zamknięciu różnych procesów metabolicznych i prowadzących je białek w różnych przedziałach ograniczonych błoną. Jak omówiono w rozdz. 11 i 12, błony komórkowe stwarzają selektywnie przepuszczalne bariery, pozwalające — w przypadku większości cząsteczek — na kontrolowanie ich transportu zachodzącego przez te błony. W tym rozdziale zajmiemy się strategią rozdzielenia przestrzennego i pewnymi jego konsekwencjami.

W pierwszej części opiszemy główne, ograniczone błoną przedziały komórek eukariotycznych, czyli *błonowe organelle,* i zajmiemy się pokrótce ich głównymi funkcjami oraz prawdopodobnym pochodzeniem ewolucyjnym. W drugiej części omówimy, jak skład białkowy różnych przedziałów zostaje ustalony i podtrzymany. Każdy przedział zawiera specyficzny zestaw białek, które musiały zostać selektywnie przeniesione z cytozolu — gdzie powstają — do przedziału, w którym są używane. Ten proces przenoszenia, o nazwie *sortowanie białek*, zależy od sygnałów wbudowanych w aminokwasową sekwencję białek. W trzeciej części opiszemy, w jaki sposób pewne przedziały błonowe komórki eukariotycznej kontaktują się

ORGANELLE BŁONOWE

- **Komórki eukariotyczne zawierają podstawowy zestaw organelli błonowych**
- **Organelle błonowe ewoluowały w różny sposób**

SORTOWANIE BIAŁEK

- **Import białek do organelli jest zapewniony przez trzy mechanizmy**
- **Sekwencje sygnałowe kierują białka do właściwego przedziału**
- **Białka wnikają do jądra przez pory jądrowe**
- **Białka ulegają rozfałdowaniu przed wejściem do mitochondriów i chloroplastów**
- **Do retikulum endoplazmatycznego białka wchodzą w trakcie swojej syntezy**
- **Białka rozpuszczalne są uwalniane do światła ER**
- **Sygnały start i stop wyznaczają ustawienie białka transbłonowego w dwuwarstwie lipidowej**

TRANSPORT PĘCHERZYKOWY

- **Pęcherzyki transportujące przenoszą białka ropuszczalne i błony między przedziałami**
- **Pączkowaniem pęcherzyków kieruje układ białek opłaszczających**
- **Specyficzność przywierania pęcherzyków do błony zależy od białek SNARE**

DROGI SEKRECYJNE

- **Większość białek ulega w ER kowalencyjnej modyfikacji**
- **Wyjście z ER jest kontrolowane, aby zapewnić poprawną jakość wyprowadzanego białka**
- **Białka są dalej modyfikowane i sortowane w aparacie Golgiego**
- **Białka sekrecyjne są uwalniane z komórki w drodze egzocytozy**

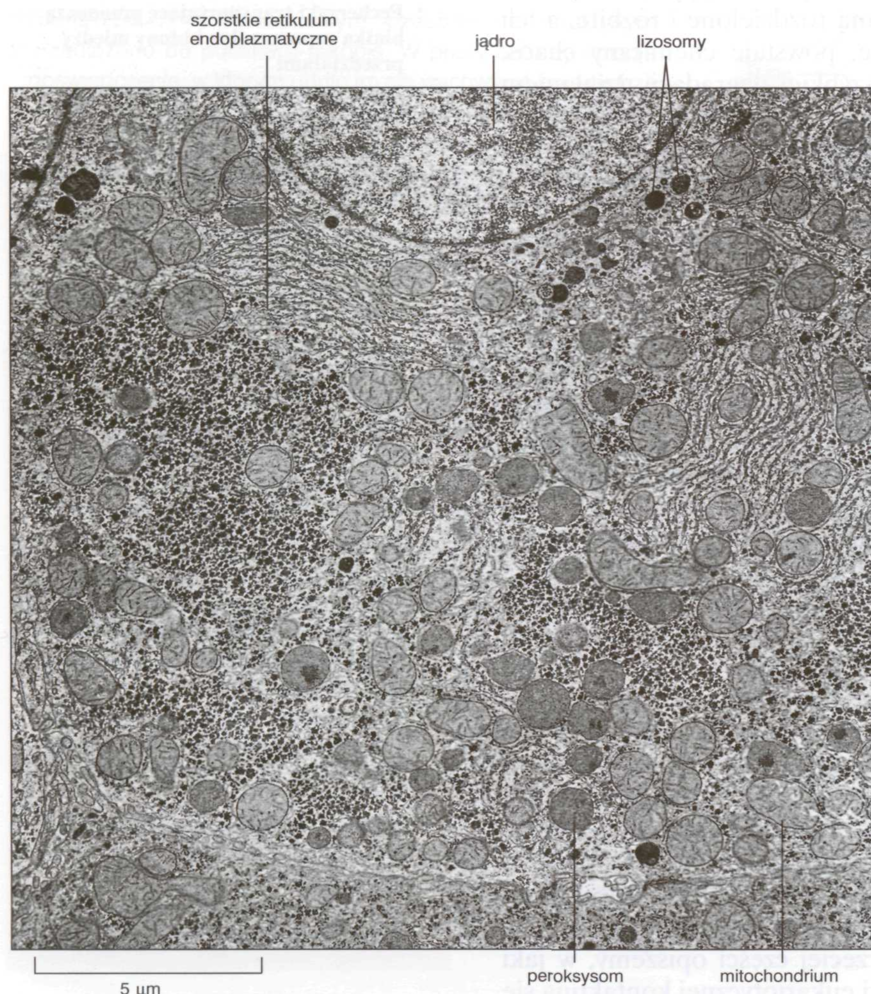
DROGI ENDOCYTOZY

- **Wyspecjalizowane komórki fagocytujące wchłaniają duże cząstki**
- **Płyn i makrocząsteczki są pobierane na drodze pinocytozy**
- **Endocytoza przebiegająca z udziałem receptorów stanowi specyficzną drogę prowadzącą do wnętrza komórek zwierzęcych**
- **Makrocząsteczki doprowadzone przez endocytozę są sortowane w endosomach**
- **Lizosomy są głównym miejscem trawienia wewnątrzkomórkowego**

ze sobą, wytwarzając małe *pęcherzyki* błonowe, które odpączkowują z jednego przedziału, przemieszczają się przez cytozol i dokonują fuzji z błoną drugiego przedziału w procesie o nazwie *transport pęcherzykowy*. W ostatnich dwóch częściach rozważymy, w jaki sposób ten stały ruch pęcherzyków zapewnia wydzielanie białek z komórki w procesie egzocytozy i pobierania ich w procesie *endocytozy*.

Organelle błonowe

O ile komórka prokariotyczna jest tylko pojedynczym przedziałem, **cytozolem,** otoczonym błoną komórkową, o tyle wnętrze komórki eukariotycznej jest w skomplikowany sposób porozdzielane przez błony wewnętrzne. Błony te tworzą zamknięte przedziały, w których zestawy enzymów mogą działać bez przeszkód ze strony reakcji zachodzących w innych przedziałach. Gdy bada się pod mikroskopem elektronowym skrawki komórek roślinnych lub zwierzęcych, widzi się liczne małe błoniaste woreczki, rurki i struktury kuliste lub nieregularne, często rozmieszczone bez widocznego uporządkowania (rys. 14-1). Wszystkie te struktury są oddzielnymi organellami błonowymi lub częściami takich organelli, a każda z nich zawiera specyficzny zestaw dużych i małych cząsteczek.

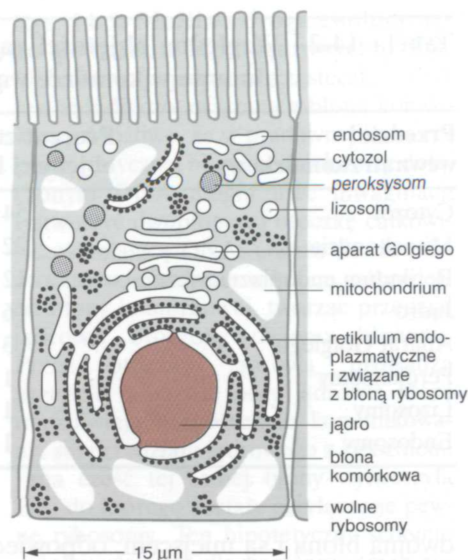


Rys. 14-1. Mikrografia elektronowa poprzecznego przekroju części komórki wątroby. Widoczne są przykłady wielu głównych organelli błonowych. Małe czarne ziarnistości widoczne pomiędzy oddzielonymi przez błony przedziałami są ziarnami glikogenu (glikosomami); stanowią one agregacje glikogenu z enzymami kontrolującymi jego syntezę i rozkład. (Dzięki uprzejmości: Daniel S. Friend)

Komórki eukariotyczne zawierają podstawowy zestaw organelli błonowych

Główne organelle błonowe komórki zwierzęcej przedstawiono na rys. 14-2, a ich funkcje zestawiono w tab. 14-1. Organelle są otoczone przez cytozol, który *jest ograniczony błoną komórkową. Największą organellą* we wszystkich komórkach jest *jądro.* Jest ono otoczone podwójną błoną znaną jako *otoczka jądrowa* i komunikuje się z cytozolem poprzez *pory jądrowe*, otwory w otoczce. Zewnętrzna błona otoczki jądrowej pozostaje w ciągłości z błoną *retikulum endoplazmatycznego (ER),* które jest ciągłym systemem wzajemnie połączonych błonowych woreczków i rurek, często przebiegających przez większą część komórki. ER jest głównym miejscem syntezy nowych błon w komórce. Duża część powierzchni ER jest pokryta przylegającymi od strony cytoplazmy rybosomami i stąd jej nazwa *retikulum endoplazmatyczne szorstkie*. Rybosomy biorą aktywny udział w syntetyzowaniu białek wprowadzanych do światła ER lub do jego błony. *ER gładkie* jest w większości komórek nieliczne, ale jest silnie rozwinięte w innych komórkach, gdzie pełni szczególne funkcje; jest na przykład miejscem syntezy hormonów steroidowych w komórkach nadnercza i miejscem detoksykacji różnych związków organicznych, łącznie z alkoholem, w komórkach wątroby.

Aparat Golgiego, usytuowany zazwyczaj blisko jądra, otrzymuje z ER białka i lipidy, modyfikuje je, a następnie rozdziela do innych miejsc przeznaczenia w komórce. *Lizosomy* są małymi woreczkami zawierającymi enzymy trawienne. Degradują one zarówno zużyte organelle, jak i makrocząsteczki oraz cząstki pobrane przez komórkę w procesie endocytozy. W swojej drodze do lizosomów materiały pobrane przez endocytozę muszą najpierw przejść przez zestaw przedziałów o nazwie *endosomy,* które wysortowują pewne wchłonięte cząsteczki i zwracają je kierując z powrotem do błony komórkowej. *Peroksysomy* są małymi organellami ograniczonymi pojedynczą błoną. Zawierają enzymy działające w różnych reakcjach oksydacyjnych, które rozkładają lipidy i niszczą cząsteczki toksyczne. *Mitochondria* i *chloroplasty* (w komórkach roślinnych) są otoczone po-



Rys. 14-2. Główne organelle błonowe komórki zwierzęcej. Przedstawiona komórka nabłonka jelitowego zawiera podstawowy zestaw organelli występujących w większości komórek zwierzęcych. Jądro, retikulum endoplazmatyczne (ER), aparat Golgiego, lizosomy, endosomy, mitochondria i peroksysomy są odrębnymi przedziałami oddzielonymi od cytozolu (kolor *szary*) przez przynajmniej jedną selektywnie przepuszczalną błonę. Pokazano również rybosomy, chociaż nie są one osłonięte błoną oraz są zbyt małe, aby można je zobaczyć w mikroskopie świetlnym i dlatego nie spełniają zasadniczej definicji organelli. Pewne rybosomy występują swobodnie w cytozolu, a inne są związane z cytozolową powierzchnią ER

Tabela 14-1. Główne funkcje przedziałów błonowych komórki eukariotycznej

Przedział	Główna funkcja
Cytozol	liczne szlaki metaboliczne (rozdz. 3 i 4); synteza białka (rozdz. 7)
Jądro	miejsce głównego genomu (rozdz. 8); synteza DNA i RNA (rozdz. 6 i 7)
Retikulum endoplazmatyczne (ER)	synteza większości lipidów (rozdz. 11); synteza białek przeznaczonych do wielu organelli i do błony komórkowej (ten rozdział)
Aparat Golgiego	modyfikacja, sortowanie i pakowanie białek oraz lipidów, zarówno w celu ich wydzielenia, jak i dostarczenia do innej organelli (ten rozdział)
Lizosomy	degradacja wewnątrzkomórkowa (ten rozdział)
Endosomy	sortowanie materiału pobranego w drodze endocytozy (ten rozdział)
Mitochondria	synteza ATP — fosforylacja oksydacyjna (rozdz. 13)
Chloroplasty (w komórkach roślinnych)	synteza ATP i wiązanie węgla — fotosynteza (rozdz. 13)
Peroksysomy	utlenianie cząsteczek toksycznych

Tabela 14-2. **Względne objętości zajmowane przez główne organelle błonowe w komórce wątroby (hepatocycie)**

Przedział wewnątrzkomórkowy	Procent całkowitej objętości komórki	Przybliżona liczba w komórce
Cytozol	54	1
Mitochondria	22	1700
Retikulum endoplazmatyczne	12	1
Jądro	6	1
Aparat Golgiego	3	1
Peroksysomy	1	400
Lizosomy	1	300
Endosomy	1	200

dwójną błoną i są miejscem, odpowiednio, fosforylacji oksydacyjnej i fotosyntezy (omówionych w rozdz. 13). Obie te organelle zawierają błony wysoce wyspecjalizowane w wytwarzaniu ATP.

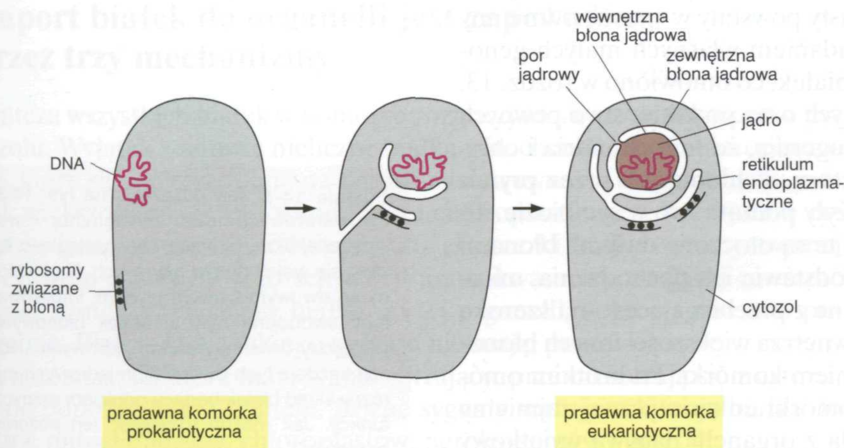
Wiele organelli błonowych, w tym ER, aparat Golgiego, mitochondria i chloroplasty, zajmuje w komórce określone miejsca dzięki przyczepieniu do cytoszkieletu, a zwłaszcza do mikrotubul. Filamenty cytoszkieletu wytyczają trasy przemieszczania się organelli i kierowanego ruchu pęcherzyków pomiędzy organellami. Ruchy te napędzane są białkami motorycznymi, które zużywają energię hydrolizy ATP do popychania organelli i pęcherzyków wzdłuż filamentów, jak omówiono to w rozdz. 16.

Organelle błonowe zajmują przeciętnie prawie połowę objętości komórki eukariotycznej (tab. 14-2), a cała powierzchnia zaangażowanych błon jest ogromna. Na przykład w komórce ssaka powierzchnia błony ER jest 20–30 razy większa niż błony komórkowej. W większości komórek eukariotycznych, zarówno pod względem masy, jak i powierzchni, błona komórkowa stanowi jedynie niewielką część struktur błonowych.

Skład i funkcje organelli można poznać dopiero po odizolowaniu ich od innych struktur komórkowych. Ponieważ organelle są zbyt małe, aby izolować je ręcznie, oddzielenie ich uzyskuje się przez *wirowanie* różnicowe (opisane w panelu 5-4, s. 160–161). Po oczyszczeniu danego typu organelli można zidentyfikować jej białka. W wielu przypadkach organelle można inkubować w probówce, w warunkach umożliwiających badanie ich funkcji. Na przykład izolowane mitochondria mogą wytwarzać ATP podczas utleniania pirogronianu do CO_2 i wody, jeśli dostarczy się im ADP i O_2.

Organelle błonowe ewoluowały w różny sposób

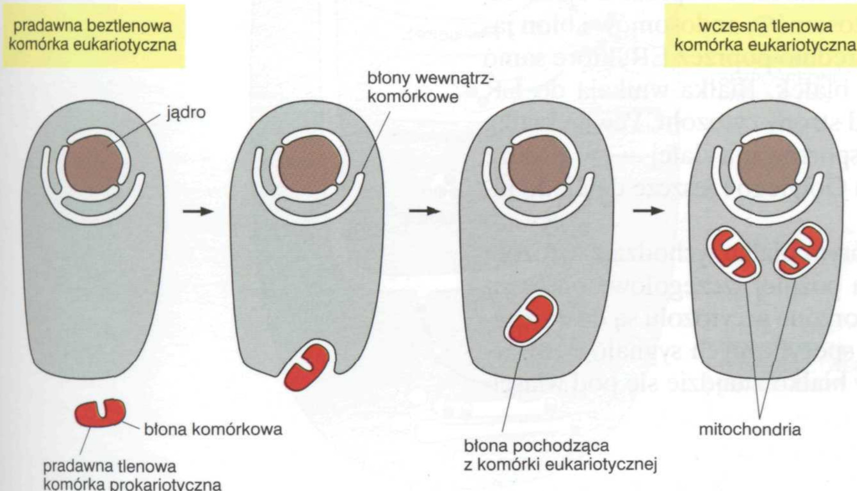
W zrozumieniu związków między poszczególnymi przedziałami obecnej komórki eukariotycznej pomocne jest rozważenie, jaka mogła być droga ich ewolucji. Przedziały powstawały prawdopodobnie etapami. Uważa się, że prekursorami pierwszych komórek eukariotycznych były proste mikroorganizmy przypominające bakterię, które miały błonę komórkową bez żadnych błon wewnętrznych. Błona komórkowa takich komórek musiała zapewnić wszystkie funkcje związane z błoną, łącznie z syntezą ATP i syntezą lipidów, tak jak czyni to błona komórkowa większości współczesnych bakterii. Bakteriom może takie urządzenie wystarczyć ze względu na ich małą wielkość i na wynikającą stąd dużą wartość stosunku powierzchni do objętości; ich błona komórkowa wystarcza do podtrzymania wszystkich funkcji życiowych, dla których błona jest niezbędna. Jednak dzisiejsze ko-



Rys. 14-3. Możliwa droga ewolucyjnego powstania błon jądrowych i ER. U bakterii pojedyncza cząsteczka DNA jest zasadniczo związana z błoną komórkową. Możliwe, że w pradawnej komórce prokariotycznej błona komórkowa z dołączonym DNA mogła ulec inwaginacji i utworzyć dwubłonową otoczkę całkowicie osłaniającą DNA. Uważa się, że taka otoczka oderwała się w końcu całkowicie od błony komórkowej, tworząc przedział jądrowy, otoczony dwiema błonami. Przez otoczkę jądrową prowadzą przejścia o nazwie pory jądrowe, które umożliwiają bezpośrednie komunikowanie się przedziału jądrowego z cytozolem. Inna część tej samej błony wytworzyła ER, do którego zostały przyłączone pewne rybosomy. Ten hipotetyczny schemat mógłby wyjaśnić, dlaczego przestrzeń pomiędzy wewnętrzną i zewnętrzną błoną jądrową pozostaje w ciągłości ze światłem ER

mórki eukariotyczne mają objętość 1000–10000 razy większą niż typowa bakteria, np. *E. coli*. Tak wielka komórka ma niską wartość stosunku powierzchni do objętości i prawdopodobnie nie mogłaby przeżyć z błoną komórkową jako jedyną błoną. Tak więc przypuszczalnie wzrost wielkości typowy dla komórek eukariotycznych nie mógł nastąpić bez rozwinięcia się błon wewnątrzkomórkowych.

Uważa się, że organelle błonowe powstały w ewolucji przynajmniej dwiema drogami. Zakłada się, że otoczka jądrowa oraz błony ER, aparatu Golgiego, endosomów i lizosomów powstały przez wpuklenie się (inwaginację) błony komórkowej (rys. 14-3). Błony te, jak również otoczone przez nie inne organelle, składają się na to, co nazywamy zbiorowo *systemem błon wewnętrznych*. Jak omówimy to później, wnętrze tych organelli (z wyjątkiem jądra) komunikuje się w szerokim zakresie zarówno między sobą, jak i z otoczeniem komórki za pomocą małych pęcherzyków, które odpączkowują z danej organelli i ulegają fuzji z inną. Jak zobaczymy, zgodnie z takim proponowanym pochodzeniem ewolucyjnym, komórka z wielu względów traktuje wnętrze tych organelli jako przestrzeń „zewnątrzkomórkową". Hipotetyczny schemat przedstawiony na rys. 14-3 wyjaśnia, jak jądro mogło zostać otoczone dwiema błonami. Aczkolwiek wpuklanie błony rzadko występuje u dzisiejszych bakterii, pojawia się ono u pewnych bakterii fotosyntetyzujących, u których obszary błony komórkowej zawierające aparat fotosyntezy są wciągane do wnętrza, tworząc wewnątrzkomórkowe pęcherzyki.



Rys. 14-4. Przypuszczalne ewolucyjne pochodzenie mitochondriów. Uważa się, że mitochondria powstały przez wchłonięcie tlenowej komórki prokariotycznej przez większą beztlenową komórkę eukariotyczną. Podobnie chloroplasty powstały później przez wchłonięcie fotosyntetyzującej komórki prokariotycznej przez tlenową komórkę eukariotyczną. Wyjaśniałoby to, dlaczego organelle te mają po dwie błony i dlaczego nie biorą udziału w transporcie pęcherzykowym, który dynamicznie łączy pozostałe przedziały wewnątrzkomórkowe

Uważa się, że mitochondria i chloroplasty powstały w sposób odmienny od innych organelli; różnią się one posiadaniem własnych małych genomów DNA i zdolnością syntezy własnych białek, co omówiono w rozdz. 13. Podobieństwo ich genomów do bakteryjnych oraz podobieństwo pewnych ich białek do białek bakteryjnych silnie sugerują, że mitochondria i chloroplasty powstały podczas ewolucji z bakterii, wchłoniętych przez prymitywne komórki eukariotyczne, z którymi żyły początkowo w symbiozie. To wyjaśniałoby również, dlaczego organelle te są otoczone dwiema błonami (rys. 14-4). Jak można by oczekiwać na podstawie ich pochodzenia, mitochondria i chloroplasty pozostają izolowane z przebiegającego na szeroką skalę ruchu pęcherzykowego, który łączy wnętrza większości innych błonowych organelli pomiędzy sobą i z otoczeniem komórki. Po krótkim omówieniu głównych organelli błonowych komórki eukariotycznej zajmiemy się teraz problemem, w jaki sposób każda z organelli nabywa wyjątkowy dla siebie zestaw białek.

Pytanie 14-1. Jak pokazano na rys. 14-3, dwuwarstwa lipidowa zewnętrznej i wewnętrznej błony jądrowej tworzy ciągłość, łącząc się wokół porów jądrowych. To, że błony są dwuwymiarowym płynem, implikowałoby swobodną dyfuzję białek błonowych pomiędzy dwiema błonami jądrowymi. Jednak każda z tych dwóch błon jądrowych ma różny skład białek będący odbiciem różnych funkcji. Jak można rozwiązać ten pozorny paradoks?

Sortowanie białek

Zanim komórka eukariotyczna podzieli się na dwie, musi podwoić swoje organelle błonowe. Komórka nie może tworzyć tych organelli *de novo*; do ich powstania potrzebna jest informacja zawarta w samych organellach. Tak więc większość organelli powstaje z organelli już istniejących, które rosną, a następnie dzielą się. W miarę wzrostu komórek zachodzącego w ich cyklu życiowym (omówionym w rozdz. 17), organelle błonowe powiększają się przez wbudowywanie nowych cząsteczek. Następnie organelle dzielą się i przy podziale komórki rozdzielane są do dwóch komórek potomnych. Otoczka jądrowa, ER i aparat Golgiego rozpadają się na małe pęcherzyki, które odtwarzają pełne struktury dopiero po uformowaniu dwóch komórek potomnych (omówiono w rozdz. 17). Wzrost organelli wymaga dostawy nowych lipidów do rozbudowy błony oraz dostawy odpowiednich białek — zarówno białek błonowych, jak i rozpuszczalnych, które wypełniają wnętrze organelli. Nawet w komórkach, które nie dzielą się, białka muszą być ustawicznie i precyzyjnie dostarczane do organelli, zarówno aby zapewnić ciągłość sekrecji, jak i wymienić zdegradowane białka organelli. Dlatego problem, jak rozbudować i utrzymać organellę błonową, sprowadza się zasadniczo do tego, jak kierować nowo wytworzone białka do właściwej im organelli.

Do pewnych organelli, w tym mitochondriów, chloroplastów i peroksysomów oraz do wnętrza jądra, białka są dostarczane wprost z cytozolu. Do innych, w tym do aparatu Golgiego, lizosomów, endosomów i błon jądrowych, białka i lipidy są dostarczane pośrednio poprzez ER, które samo jest głównym miejscem syntezy lipidów i białek. Białka wnikają do ER z rybosomów przywartych do błony ER od strony cytozolu. Pewne białka pozostają w ER, ale większość jest transportowana dalej — w drodze transportu pęcherzykowego — do aparatu Golgiego i jeszcze dalej, do innych organelli lub błony komórkowej.

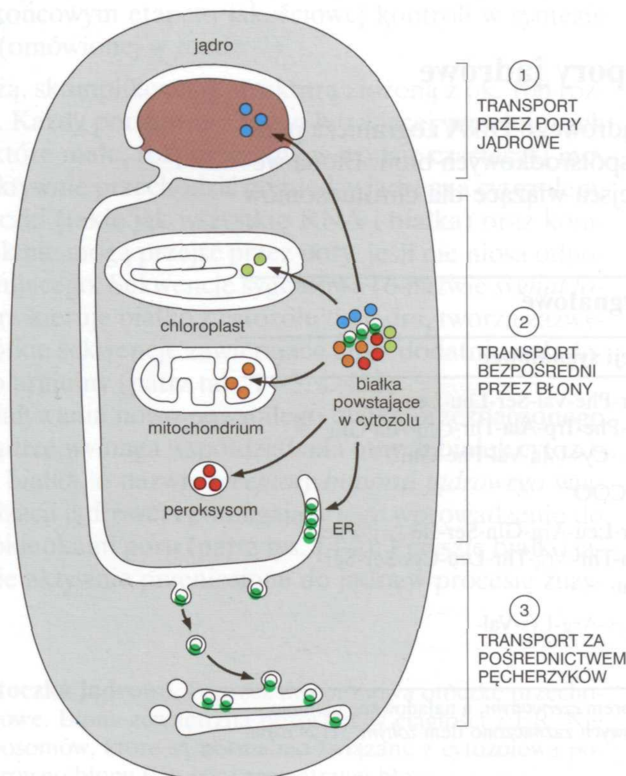
W tej części omówimy mechanizm, którym białka wchodzą z cytozolu do organelli błonowych, pozostawiając na później szczegółowe omówienie transportu pęcherzykowego. Białka tworzone w cytozolu są dostarczane do różnych miejsc w komórce według specyficznych sygnałów zawartych w ich sekwencji aminokwasowej. Gdy białko znajdzie się pod właściwym adresem, wnika do organelli.

Import białek do organelli jest zapewniony przez trzy mechanizmy

Synteza wszystkich białek w komórce rozpoczyna się na rybosomach w cytozolu. Wyjątek stanowią nieliczne białka mitochondrialne i chloroplastowe, które są syntetyzowane na rybosomach wewnątrz tych organelli; jednak większość białek mitochondriów i chloroplastów jest tworzona w cytozolu i następnie importowana. Los cząsteczki białka syntetyzowanej w cytozolu zależy od jego sekwencji aminokwasowej, mogącej zawierać *sygnał sortujący*, kierujący białko do tej organelli, w której jest ono potrzebne. Białka, które takiego sygnału nie mają, pozostają stale w cytozolu, natomiast te, które mają sygnał sortujący, przemieszczają się z cytozolu do odpowiedniej organelli. Różne sygnały sortujące kierują białka do jądra, mitochondriów, chloroplastów, peroksysomów i do ER.

Głównym problemem dla organelli błonowej importującej białko z cytozolu lub innej organelli jest to, jak przeprowadzić białko przez błony, które są normalnie nieprzepuszczalne dla hydrofilowych makrocząsteczek. Uzyskuje się to drogami różnymi dla różnych organelli, przy czym wszystkie one wymagają nakładu energii.

1. Białka przechodzące z cytozolu do jądra są transportowane przez pory jądrowe, przenikające wewnętrzną i zewnętrzną błonę jądrową. Pory działają jak selektywne bramki, które aktywnie transportują specyficzne makrocząsteczki, ale zarazem umożliwiają swobodną dyfuzję mniejszych cząsteczek (mechanizm 1 na rys. 14-5).
2. Białka przechodzące z cytozolu do ER, mitochondriów, chloroplastów lub peroksysomów są transportowane poprzez błonę organelli przez *translokazy białek* mieszczące się w błonie. Odmiennie niż przy przejściu przez pory jądrowe, cząsteczka transportowanego białka musi się najpierw rozfałdować, aby „prześliznąć się" przez błonę (mechanizm 2 na rys. 14-5). Bakterie mają w swej błonie komórkowej podobne translokazy białek.



Rys. 14-5. Trzy główne mechanizmy, którymi organelle błonowe importują białka. W mechanizmie 1 i 3 na etapie transportu białko pozostaje w postaci sfałdowanej, ale w mechanizmie 2 musi być zazwyczaj rozfałdowane. Wszystkie te procesy wymagają dopływu energii

3. Białka przemieszczające się od ER dalej oraz z jednego przedziału systemu błon wewnętrznych do przedziału drugiego są transportowane mechanizmem zasadniczo różnym od dwóch poprzednich. Są on niesione przez *pęcherzyki transportujące*, które są obarczane ładunkiem białek pochodzących z wewnętrznej przestrzeni, czyli *światła*, jednego przedziału, gdy odpączkowują od jego błony. Następnie pęcherzyki wprowadzają ten ładunek do drugiego przedziału, gdy ich błona ulega fuzji z błoną tego przedziału (mechanizm 3 rys. 14-5). W procesie tym z pierwszego przedziału do drugiego przekazywane są również błonowe lipidy i białka.

Sekwencje sygnałowe kierują białka do właściwego przedziału

Typowy sygnał sortujący w białku jest ciągłym odcinkiem sekwencji aminokwasów, zazwyczaj o długości 15–60 aminokwasów. Ta **sekwencja sygnałowa** jest często (ale nie zawsze) usuwana z dojrzałego białka, gdy tylko spełniła swą funkcję sortującą. Pewne sekwencje sygnałowe kierujące do różnych celów w komórce pokazano w tab. 14-3. Sekwencje sygnałowe są zarazem niezbędne i wystarczające do skierowania białka do poszczególnej organelli. Wykazano to przez doświadczenia, w których sekwencję albo opuszczono, albo przeniesiono z jednego białka na drugie, posługujące się technikami inżynierii genetycznej (omówionymi w rozdz. 10). Na przykład, opuszczenie sekwencji sygnałowej z białka przeznaczonego do ER zamienia je w białko cytozolowe, natomiast dołączenie sekwencji sygnałowej dla ER do początku białka cytozolowego przy końcu N kieruje to białko do ER (rys. 14-6). Sekwencje sygnałowe kierujące do tego samego przedziału mogą się między sobą bardzo różnić, chociaż mają tę samą funkcję; właściwości fizyczne, takie jak hydrofobowość lub rozmieszczenie naładowanych aminokwasów, wydają się tu ważniejsze niż sama sekwencja aminokwasów.

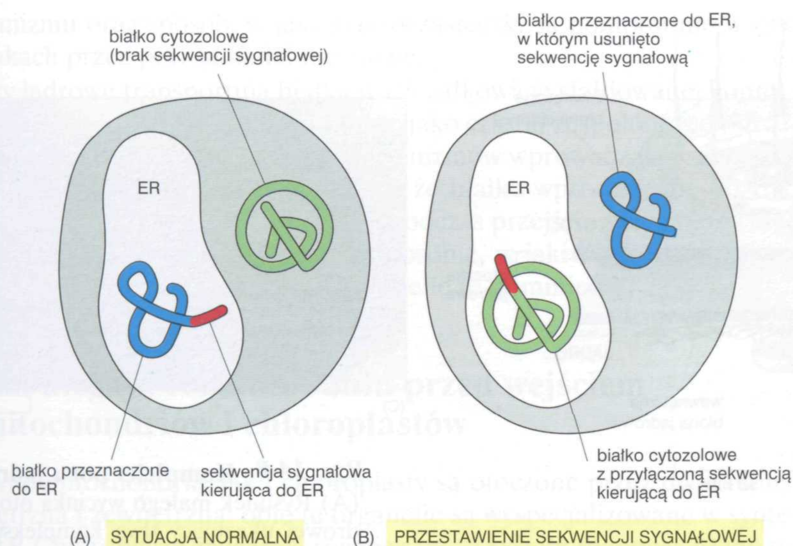
Białka wnikają do jądra przez pory jądrowe

Otoczka jądrowa stanowi opakowanie jądrowego DNA i ogranicza przedział jądrowy. Utworzona jest z dwóch współśrodkowych błon. Błona wewnętrzna zawiera białka służące jako miejsca wiążące dla chromosomów

Tabela 14-3. Pewne typowe sekwencje sygnałowe

Funkcja sygnału	Przykład sekwencji sygnałowej
Import do ER	$^{+}H_3N$-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln
Zatrzymanie w świetle ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO^{-}
Import do mitochondriów	$^{+}H_3N$-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Import do jądra	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Import do peroksysomów	-Ser-Lys-Leu-

Aminokwasy naładowane dodatnio zaznaczono kolorem *czerwonym*, a naładowane ujemnie — kolorem *zielonym*. Długi blok aminokwasów hydrofobowych zaznaczono tłem *żółtym*. $^{+}H_3N$ oznacza koniec N białka; COO^{-} oznacza koniec C białka.



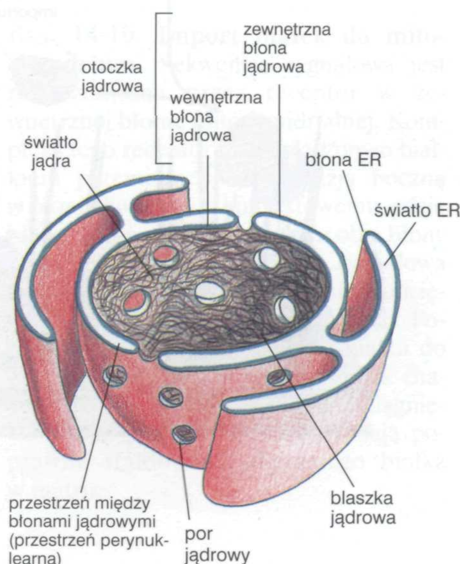
Rys. 14-6. Rola sekwencji sygnałowych przy sortowaniu białek. (A) Białka przeznaczone do ER mają przy swym końcu N sekwencję sygnałową, która kieruje je do tej organelli, natomiast białka przeznaczone do pozostania w cytozolu takiej sekwencji nie mają. (B) W doświadczeniu, które tu zilustrowano, użyto technik rekombinacji DNA w celu przyłączenia do białka cytozolowego sekwencji sygnałowej kierującej do ER oraz usunięto sekwencję sygnałową z białka przeznaczonego do ER; w obu przypadkach tak zmienione białko zostaje w końcu umieszczone w nienormalnym dla niego przedziale komórki. Wskazuje to, że sekwencja sygnałowa kierująca do ER jest zarówno niezbędna, jak i wystarczająca do wprowadzenia białka do ER

(omówione w rozdz. 8) i dla *blaszki jądrowej (nuclear lamina),* delikatnie utkanej sieci filamentów białkowych, wyścielającej wewnętrzną powierzchnię tej błony i stanowiącej sztywną podporę strukturalną dla otoczki jądrowej (omówionej w rozdz. 16). Skład zewnętrznej błony jądrowej ściśle przypomina błonę ER, z którą pozostaje w ciągłości (rys. 14-7).

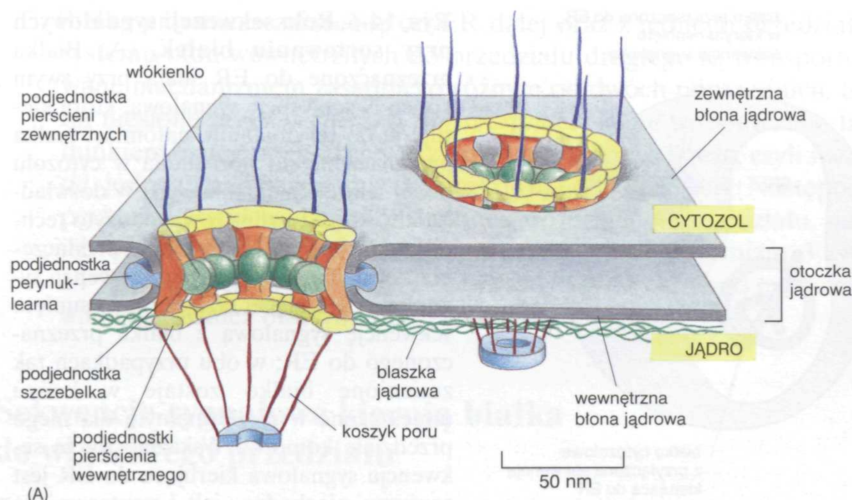
Otoczka jądrowa we wszystkich komórkach eukariotycznych jest perforowana dzięki obecności **porów jądrowych** tworzących furtki, przez które wszystkie cząsteczki wchodzą do jądra lub go opuszczają. Ruch poprzez pory zachodzi w obu kierunkach: nowo powstałe białka przeznaczone do jądra wchodzą od strony cytozolu; cząsteczki RNA syntetyzowane w jądrze i podjednostki rybosomowe, które są składane w jądrze, są eksportowane. Cząsteczki informacyjnego RNA, których splicing nie został dokończony, nie mogą opuścić jądra, co wskazuje, że transport przez otoczkę jądrową jest końcowym etapem jakościowej kontroli w syntezie i dojrzewaniu mRNA (omówionej w rozdz. 7).

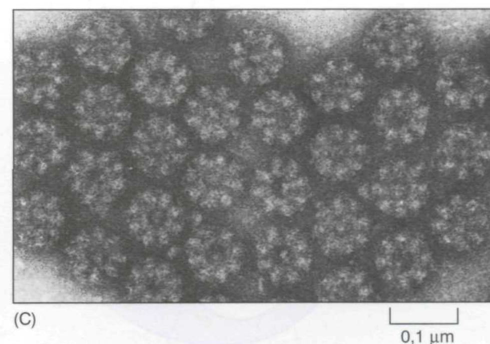
Por jądrowy jest dużą, skomplikowaną strukturą złożoną z ok. 100 różnych białek (rys. 14-8). Każdy por zawiera jeden lub więcej wypełnionych wodą kanałów, przez które małe, rozpuszczalne w wodzie cząsteczki mogą swobodnie i nieselektywnie przechodzić pomiędzy jądrem a cytozolem. Jednak większe cząsteczki (takie jak wszystkie RNA i białka) oraz kompleksy makrocząsteczek nie mogą przejść przez pory, jeśli nie niosą odpowiedniego sygnału sortującego. Sekwencję sygnałową (o nazwie *sygnał lokalizacji jądrowej*), która kieruje białko z cytozolu do jądra, tworzą zazwyczaj jedna lub dwie krótkie sekwencje zawierające kilka dodatnio naładowanych reszt lizyny lub argininy (patrz tab. 14-3, s. 456).

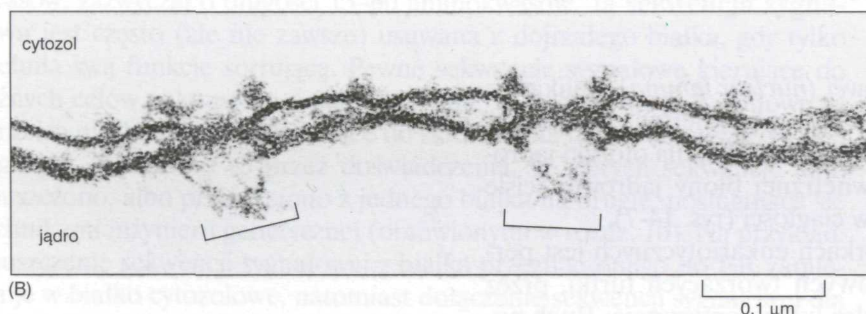
Pierwszy etap oddziaływania nowo powstałego białka przeznaczonego do umiejscowienia w jądrze wymaga współdziałania innych białek cytozolowych. Te cytozolowe białka, o nazwie *receptory importu jądrowego* wiążą się z sygnałem lokalizacji jądrowej i pomagają w jego wprowadzeniu do poru, oddziałując z włókienkami poru (patrz rys. 14-9). Przyszłe białko jądrowe zostaje następnie aktywnie przeniesione do jądra w procesie zuży-



Rys. 14-7. Otoczka jądrowa. Poprzez dwubłonową otoczkę przechodzą pory jądrowe. Błona zewnętrzna pozostaje w ciągłości z ER. Nie pokazano rybosomów, które są normalnie związane z cytozolową powierzchnią zarówno błony ER, jak i zewnętrznej błony jądrowej

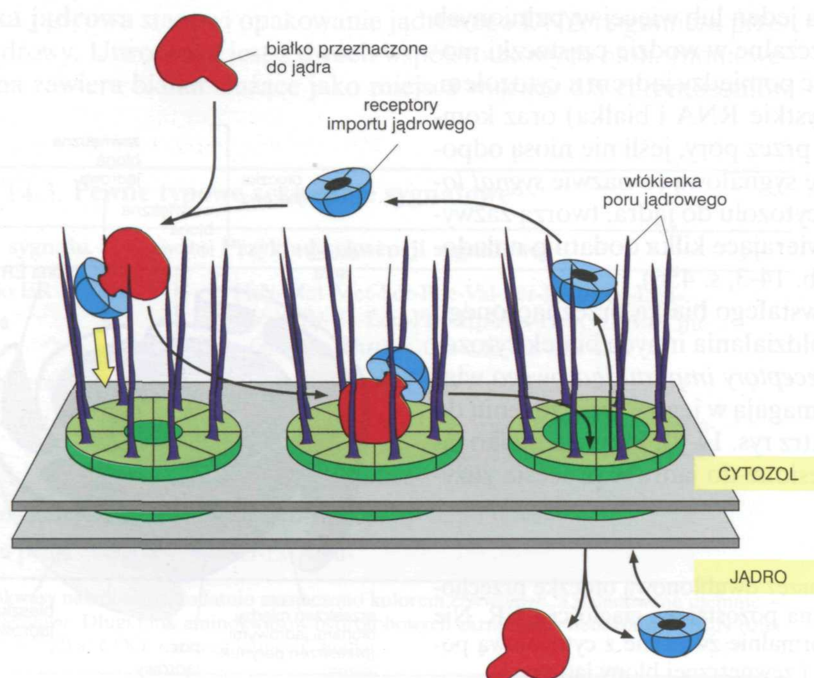






Rys. 14-8. Kompleks poru jądrowego. (A) Rysunek małego wycinka otoczki jądrowej ukazujący dwa kompleksy porowe. Każdy kompleks składa się z dużej liczby różnych podjednostek białkowych. Ku obydwu stronom kompleksu wystają włókienka białkowe; od strony światła jądra zbiegają się one, tworząc strukturę koszyka. Odstępy pomiędzy włókienkami są dostatecznie szerokie, aby włókienka nie utrudniały dostępu do poru. (B) Mikrografia elektronowa wycinka otoczki jądrowej, przedstawiająca obraz dwóch porów jądrowych w przekroju poprzecznym. (C) Mikrografia elektronowa ukazująca budowę jądrowych kompleksów porowych oglądanych powierzchniowo w błonach poddanych działaniu detergentu. (Dzięki uprzejmości: B — Werner W. Franke; C — Ron Milligan)

wającym energię hydrolizy GTP. Struktura środka poru jądrowego działa jak ściśle dopasowana przesłona fotograficzna; otwiera się ona tylko na tyle, aby umożliwić przejście kompleksu białkowego. Następnie receptory importu jądrowego powracają do cytozolu, także przez por, i będą używane ponownie (rys. 14-9). Podstawy molekularne tego bramkującego



Rys. 14-9. Schematyczne przedstawienie mechanizmu aktywnego transportu przez pory jądrowe. W pierwszym etapie transportu do białek przeznaczonych do jądra wiążą się wyspecjalizowane cytozolowe białka o nazwie: receptory importu jądrowego. Taki kompleks jest kierowany do poru jądrowego przez włókienka wystające z poru w kierunku cytozolu. Związanie białka przeznaczonego do jądra z porem otwiera ten por, a białko kierowane do jądra wraz ze swym związanym receptorem zostaje aktywnie przeniesione do jądra. Następnie receptory są wyprowadzane z powrotem przez pory do cytozolu, gdzie mogą być użyte ponownie

mechanizmu oraz sposób, w jaki makrocząsteczki są pompowane w obu kierunkach przez por, są nadal nie znane.

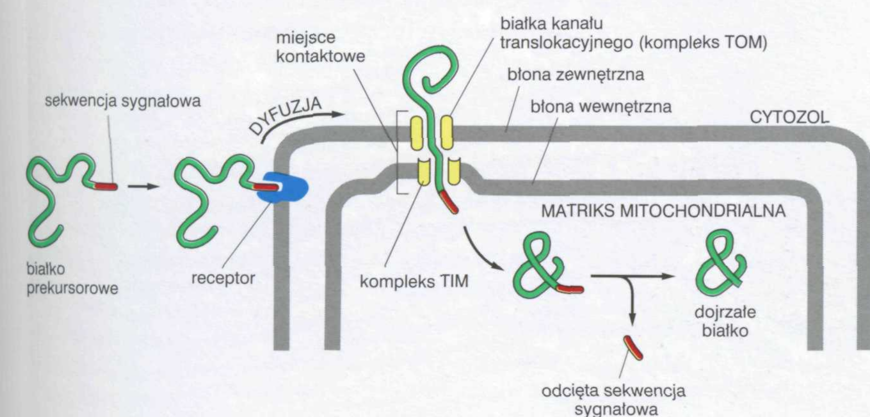
Pory jądrowe transportują białka w ich całkowicie sfałdowanej konformacji i przenoszą składniki rybosomowe jako cząstki zespolone, co odróżnia ten mechanizm transportu od mechanizmów wprowadzających białka do innych organelli. Opiszemy później, że białka wprowadzane do ER, mitochondriów i chloroplastów muszą podczas przejścia przez błony ulec rozfałdowaniu. Niewiele wiadomo o sposobie, w jaki białka są wprowadzane do peroksysomów i dlatego organelle te pominiemy.

Pytanie 14-2. Dlaczego komórki eukariotyczne wymagają jądra jako oddzielnego przedziału, skoro komórki prokariotyczne świetnie bez niego prosperują?

Białka ulegają rozfałdowaniu przed wejściem do mitochondriów i chloroplastów

Zarówno mitochondria, jak i chloroplasty są otoczone przez dwie błony, wewnętrzną i zewnętrzną; obie te organelle są wyspecjalizowane w syntezie ATP. Chloroplasty zawierają również trzeci system błonowy, błonę tylakoidu (omówioną w rozdz. 13). Aczkolwiek obie organelle zawierają własne genomy i wytwarzają kilka własnych białek, to większość białek mitochondrialnych i chloroplastowych jest kodowana przez geny jądrowe i importowana z cytozolu. Białka te mają zazwyczaj przy swym końcu N sekwencję sygnałową, która umożliwia im wejście albo do mitochondrium, albo do chloroplastu. Białka są przeprowadzane równocześnie poprzez obie błony, wewnętrzną i zewnętrzną, w miejscach wyspecjalizowanych, w których obie błony są w ścisłym kontakcie ze sobą*.

Tuż przed translokacją białko ulega rozfałdowaniu, a po translokacji zostaje odcinana sekwencja sygnałowa (rys. 14-10). Białka chaperony (omawiane w rozdz. 5) od strony wnętrza organelli pomagają przy przeciągnięciu białka poprzez obie błony i przy ponownym sfałdowaniu białka, gdy tylko znajdzie się ono w matriks organelli. Następny transport do poszczególnych miejsc w obrębie organelli, takich jak błona wewnętrzna, przestrzeń międzybłonowa lub błona tylakoidu, zazwyczaj wymaga obecności w białku dalszego sygnału, o nazwie sygnał sortujący, który zostaje odsłonięty często dopiero po odcięciu pierwszej sekwencji sygnałowej (targetowej). Na przykład, wbudowanie białka błonowego do błony wewnętrznej jest kierowane przez zawarte w białku sekwencje sygnałowe, które rozpoczynają i zatrzymują proces przechodzenia białka poprzez



Rys. 14-10. Import białek do mitochondrium. Sekwencja sygnałowa jest rozpoznawana przez receptor w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Kompleks tego receptora z przyłączonym białkiem przemieszcza się dyfuzją boczną w błonie ku miejscu kontaktowemu, gdzie białko ulega translokacji przez obie błony mitochondrialne. Sekwencja sygnałowa zostaje w matriks mitochondrialnej odcięta przez peptydazę takiej sekwencji. Podobny mechanizm wprowadza białka do chloroplastów. Nie pokazano białek chaperonowych, które ułatwiają przeciągnięcie białka przez błony i zapewniają poprawne sfałdowanie dojrzałego białka w matriks

* Od roku wiadomo, że kompleksy białkowego aparatu translokacyjnego są odrębne dla każdej z błon; na przykład w mitochondriach: TOM w błonie zewnętrznej i TIM w błonie wewnętrznej. Translokacja białka może zachodzić przez każdy z tych kompleksów niezależnie (*przyp. tłum.*).

błonę, co opiszemy później na przykładzie wbudowywania białka transbłonowego do błony ER.

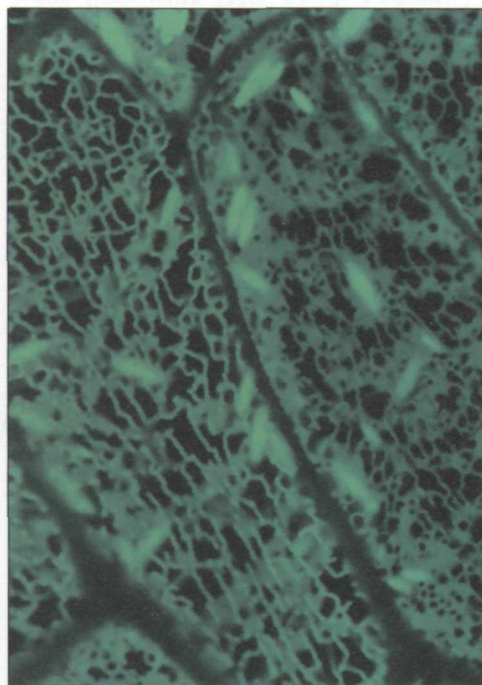
Wzrost i podtrzymanie struktury oraz funkcji mitochondriów i chloroplastów wymaga importu do ich błon nie tylko nowych białek, ale także nowych lipidów. Uważa się, że większość fosfolipidów błonowych jest importowana z ER, które stanowi główne miejsce syntezy lipidów w komórce. Fosfolipidy są transportowane do tych organelli indywidualnie przez hydrofilne białka przenoszące lipidy, które wyjmują cząsteczkę fosfolipidu z jednej błony i przekazują ją do innej.

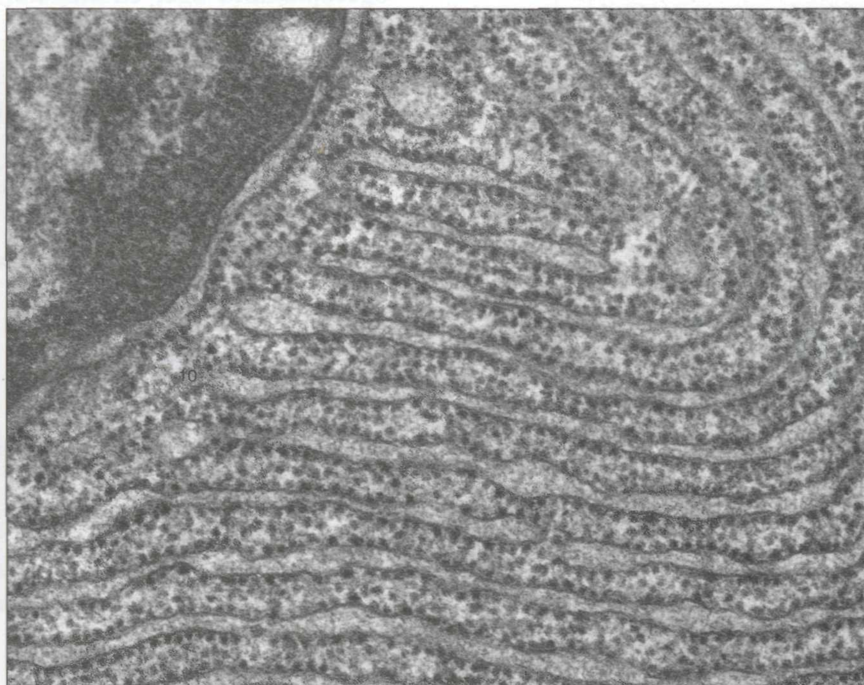
Do retikulum endoplazmatycznego białka wchodzą w trakcie swojej syntezy

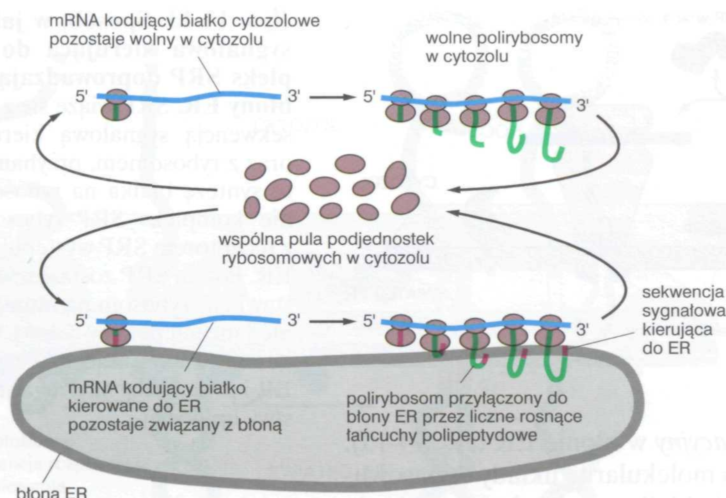
Retikulum endoplazmatyczne (ER) jest w komórce eukariotycznej najbardziej rozwiniętym systemem błonowym (rys. 14-11A) i, odmiennie niż w omawianych dotąd organellach, jest miejscem wejścia dla białek przeznaczonych zarówno do innych organelli, jak i do samego ER. Wszystkie białka przeznaczone do aparatu Golgiego, endosomów, lizosomów i błony komórkowej początkowo wnikają z cytozolu do ER. Poszczególne białka, które raz już weszły do światła ER lub do błony ER, nigdy do cytozolu nie powracają. Będą one przenoszone przez pęcherzyki transportujące z organelli do organelli, a także z organelli do błony komórkowej.

Z cytozolu są przenoszone do ER dwa rodzaje białek: 1) białka rozpuszczalne, przechodzące w całości przez błonę ER i uwalniane do światła ER; 2) przyszłe białka transbłonowe, przechodzące przez błonę ER tylko częściowo i ulegające w niej zakotwiczeniu. Białka rozpuszczalne są przeznaczone albo do sekrecji (wydzielenia na powierzchni komórki), albo do pozostania w świetle organelli. Białka transbłonowe albo pozostają w błonie ER, albo przechodzą (wraz odcinkami błony) do błon innych organelli bądź do błony komórkowej. Wszystkie te białka są początkowo

Rys. 14-11. Retikulum endoplazmatyczne. (A) Mikrografia fluorescencyjna żywej komórki roślinnej, w której widać ER jako złożoną sieć elementów płaskich i cewek. Komórki zostały zmienione metodą inżynierii genetycznej tak, iż zawierają w swoim ER białko fluoryzujące. Jaskrawe elipsy są chloroplastami. (B) Mikrografia elektronowa ukazująca szorstkie ER w komórce trzustki psa, które wytwarza i wydziela znaczne ilości enzymów trawiennych. Cytozol jest wypełniony gęsto upakowanymi warstwami ER, na których leżą rybosomy. W górnym lewym rogu widać fragment jądra i jego otoczki; należy zwrócić uwagę, że zewnętrzna błona jądrowa, stanowiąca ciągłość z ER, jest również pokryta rybosomami. (Dzięki uprzejmości: A — Jim Haseloff; B — Lelio Orci)







Rys. 14-12. Rybosomy wolne i związane z błoną. Ta sam pula rybosomów używana jest do syntezy zarówno białek pozostających w cytozolu, jak i białek transportowanych do organelli błonowych, łącznie z ER. Do błony ER rybosom, na którym rozpoczęła się synteza białka, jest kierowany przez odpowiednią sekwencję sygnałową, stanowiącą początkową część rosnącego łańcucha polipeptydowego. Cząsteczka mRNA może pozostawać przyłączona do ER jako część polirybosomu, natomiast rybosomy przesuwające się wzdłuż mRNA ulegają recyklizacji; pod koniec każdego cyklu syntezy białka podjednostki rybosomowe zostają uwolnione i włączają się do wspólnej ich puli w cytozolu

kierowane do ER przez *sekwencję sygnałową dla ER*, będącą odcinkiem 8 lub więcej aminokwasów hydrofobowych (patrz tab. 14-3, s. 456), który bierze udział w procesie translokacji przez błony.

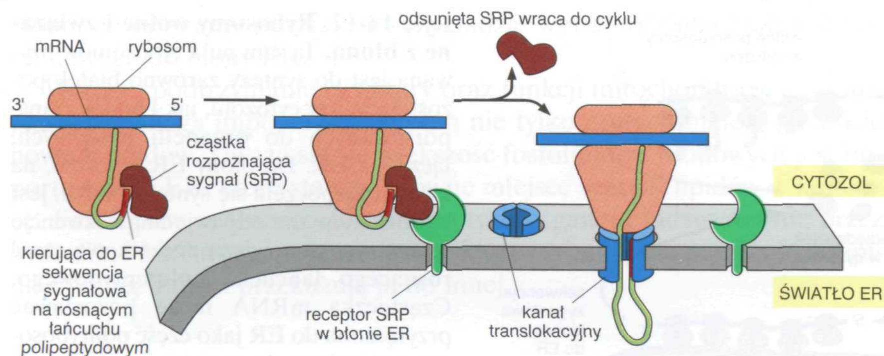
Odmiennie od białek wchodzących do jądra, mitochondriów, chloroplastów i peroksysomów większość białek wnikających do ER rozpoczyna przejście przez błonę ER, nim zostanie zakończona synteza całego łańcucha polipeptydowego. Możliwe jest to tylko wtedy, gdy rybosom syntetyzujący białko jest przyłączony do błony ER. Takie związane z błoną rybosomy pokrywają powierzchnię ER tworząc obszary nazwane **szorstkim retikulum endoplazmatycznym**, ze względu na charakterystyczny ziarnisty wygląd w mikroskopie elektronowym (rys. 14-11B).

Tak więc w cytozolu istnieją pozornie dwie odrębne populacje rybosomów. *Rybosomy związane z błoną*, przyczepione do cytozolowej strony błony ER (i zewnętrznej błony jądrowej), syntetyzujące białka przeznaczone do translokacji do ER, i *wolne rybosomy*, nie przyczepione do żadnej błony i syntetyzujące wszystkie inne białka zakodowane w jądrowym DNA. Oba te typy rybosomów są strukturalnie i funkcjonalnie identyczne, a różnią się tylko rodzajem białek, które w danym momencie wytwarzają. Gdy rybosom syntetyzuje białko zawierające sekwencję sygnałową dla ER, sekwencja ta kieruje rybosom do błony ER. W miarę translacji cząsteczki mRNA wiąże się z nią wiele rybosomów, tworząc *polirybosom* (omówiony w rozdz. 7). W przypadku cząsteczki mRNA kodującej białko z sekwencją sygnałową dla ER, polirybosom zostaje sczepiony z błoną ER przez rosnące łańcuchy polipeptydowe, które zostają wprowadzane do wnętrza błony (rys. 14-12).

Pytanie 14-3. Wyjaśnij, jak cząsteczka mRNA może pozostawać przyłączona do błony ER, gdy w tym samym czasie poszczególne rybosomy dokonujące jej translacji zostają uwolnione i po każdym cyklu translacji dołączają do cytozolowej puli rybosomów.

Białka rozpuszczalne są uwalniane do światła ER

Sekwencja sygnałowa kierująca do ER jest doprowadzana do błony ER przez przynajmniej dwa elementy molekularne. Są to: 1) *cząstka rozpoznająca sygnał (SRP)*, obecna w cytozolu i wiążąca sekwencję sygnałową dla ER, gdy tylko pojawi się ona rybosomie, oraz 2) *receptor SRP*, umieszczony w błonie ER. Związanie sekwencji sygnałowej z SRP powoduje przyhamowanie syntezy białka na rybosomie aż do momentu, gdy rybosom i związana z nim SRP zwiążą się z receptorem SRP. Po związaniu ze swym receptorem SRP pozostaje przy błonie krótki czas, potrzebny na odszukanie przez sekwencję sygnałową nowo tworzonego białka kanału translokacyjnego w błonie ER, i dopiero wtedy powraca do cytoplazmy; w tym momencie synteza białka zostaje wznowiona, a polipeptyd zostaje przesuwany jak



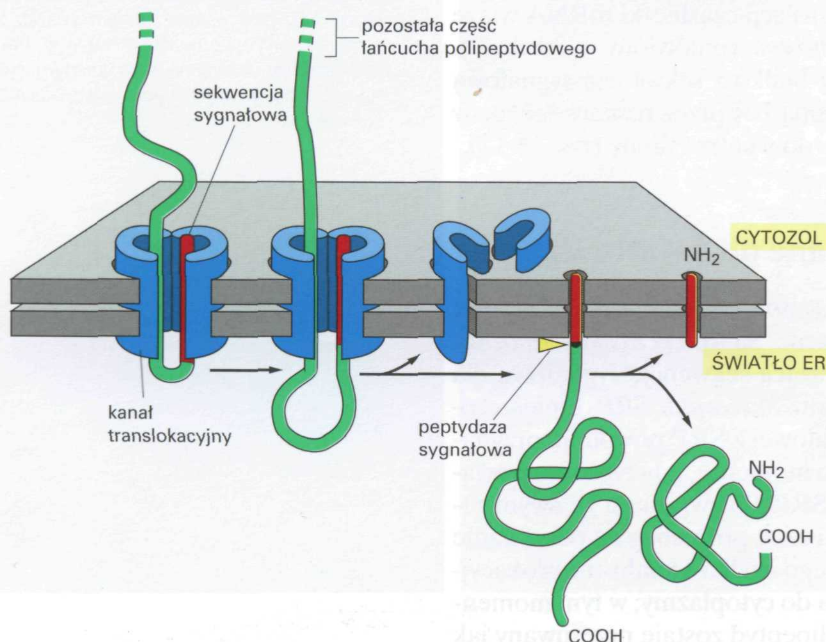
Rys. 14-13. Sposób, w jaki sekwencja sygnałowa kierująca do ER i kompleks SRP doprowadzają rybosom do błony ER. SRP wiąże się z eksponowaną sekwencją sygnałową kierującą do ER oraz z rybosomem, przyhamowując przez to syntezę białka na rybosomie. Następnie kompleks SRP–rybosom wiąże się z receptorem SRP występującym w błonie ER. Potem SRP zostaje uwolniona, pozostawiając rybosom na błonie ER. Następnie łańcuch polipeptydowy wnika do białkowego kanału translokacyjnego w błonie ER i przechodzi na drugą stronę dwuwarstwy lipidowej

nić do światła ER poprzez *kanał translokacyjny* w błonie ER (rys. 14-13). Tak więc SRP i receptor SRP działają jako molekularne układy dopasowujące, łączące rybosomy — które syntetyzują białko zawierające sekwencję sygnałową dla ER — z dostępnymi w ER kanałami translokacyjnymi.

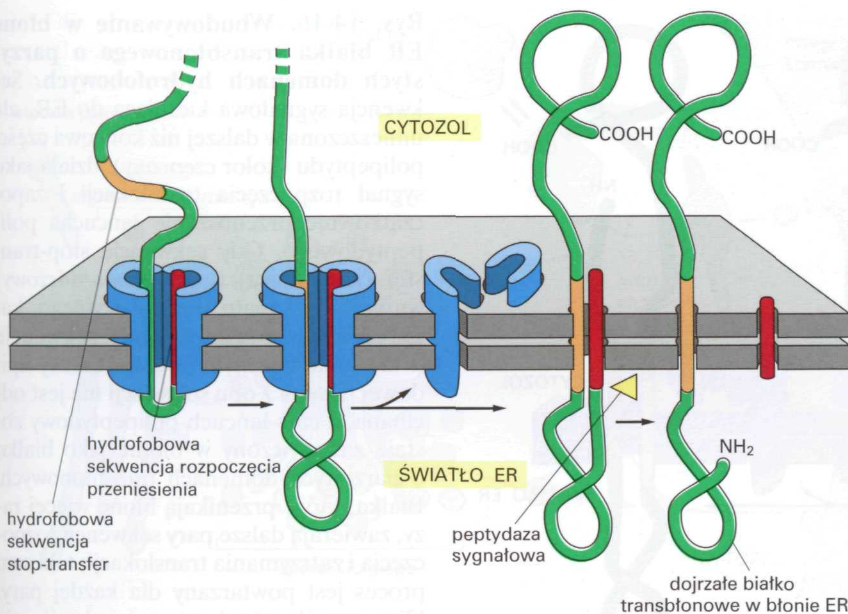
Z chwilą gdy kompleks rybosom–mRNA–SRP został przyłączony do błony ER, sekwencja sygnałowa, która w białkach rozpuszczalnych jest prawie zawsze przy końcu N białka, pełni dodatkową funkcję otwarcia kanału translokacyjnego; pozostaje ona związana z kanałem, w czasie gdy reszta łańcucha białka jest przesuwana jak nić poprzez błonę, tworząc wielką pętlę. W pewnych etapach translokacji sekwencja sygnałowa zostaje odcięta przez peptydazę sygnałową występującą od strony światła ER. Peptyd sygnałowy opuszcza wtedy kanał translokacyjny i ulega szybkiej degradacji do aminokwasów. Skoro tylko koniec C białka przejdzie przez błonę, białko zostaje uwolnione do światła ER (rys. 14-14).

Sygnały start i stop wyznaczają ustawienie białka transbłonowego w dwuwarstwie lipidowej

Nie wszystkie białka wnikające do ER są uwalniane do jego światła; niektóre z nich pozostają zakotwiczone w błonie ER jako białka transbłonowe. Proces translokacji tych białek jest bardziej skomplikowany niż



Rys. 14-14. Translokacja rozpuszczalnego białka poprzez błonę do światła ER. Białkowy kanał translokacyjny wiąże sekwencję sygnałową, a resztę peptydu przenosi aktywnie jako pętlę na drugą stronę dwuwarstwy lipidowej. W pewnym momencie procesu translokacji kanał translokacyjny otwiera się bocznie i uwalnia sekwencję sygnałową do dwuwartswy, gdzie zostaje ona odcięta enzymatycznie przez peptydazę sygnałową. Przeniesiony polipeptyd zostaje uwolniony do światła ER jako białko rozpuszczalne. Dla jasności obrazu opuszczono związane z błoną rybosomy, zarówno w tym, jak i w następnych dwóch rysunkach

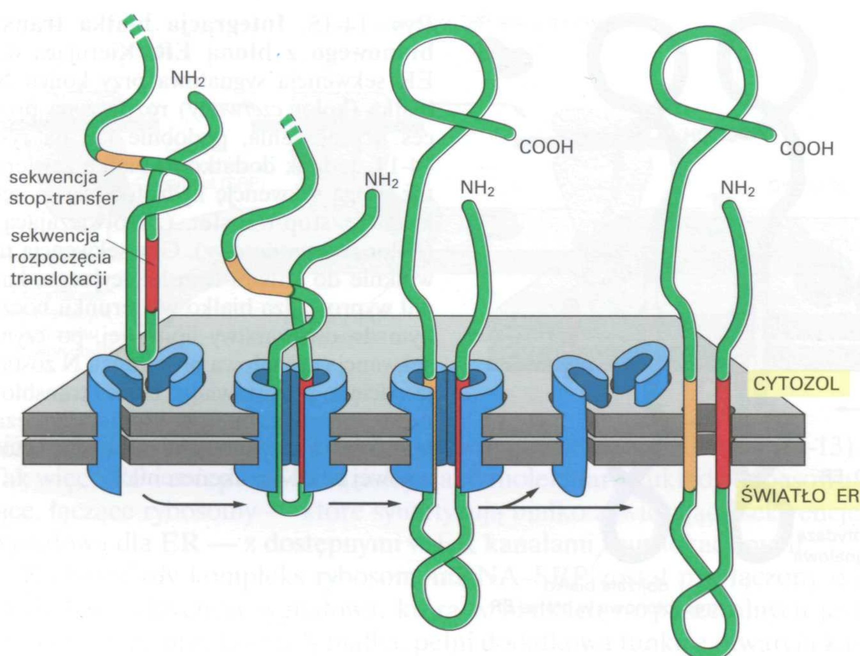


Rys. 14-15. Integracja białka transbłonowego z błoną ER. Kierująca do ER sekwencja sygnałowa przy końcu N białka (kolor *czerwony*) rozpoczyna proces przenoszenia, podobnie jak na rys. 14-14. Jednak dodatkowo białko zawiera też drugą sekwencję hydrofobową — sekwencję stop-transfer (zakotwiczającą) (kolor *pomarańczowy*). Gdy sekwencja ta wniknie do kanału translokacyjnego, kanał wyprowadza białko w kierunku bocznym do dwuwarstwy lipidowej, po czym sekwencja sygnałowa przy końcu N zostaje odcięta, pozostawiając białko transbłonowe zakotwiczone w błonie. Synteza białka jest kontynuowana po stronie cytozolowej aż do jej ukończenia

w przypadku białek rozpuszczalnych, ponieważ pewne części łańcucha polipeptydowego muszą być przeprowadzone na drugą stronę dwuwarstwy lipidowej, a inne nie.

W najprostszym przypadku, jakim jest białko transbłonowe o pojedynczym segmencie transbłonowym, sekwencja sygnałowa przy końcu N zapoczątkowuje translokację tak jak przy białkach rozpuszczalnych. Jednakże proces przenoszenia zostaje zatrzymany przez dodatkową sekwencję hydrofobowych aminokwasów — *sekwencję stop-transfer* znajdującą się na dalszym odcinku łańcucha polipeptydowego. Ta druga sekwencja zostaje przez przemieszczenie w płaszczyźnie błony uwolniona z kanału translokacyjnego do dwuwarstwy lipidowej, gdzie tworzy α helisę błonową zakotwiczającą białko w błonie. Równocześnie sekwencja sygnałowa przy końcu N zostaje również przesunięta z kanału do dwuwarstwy lipidowej i odcięta. W wyniku tego przemieszczane białko staje się białkiem transbłonowym o określonej orientacji — koniec N jest po stronie światła, a koniec C po cytozolowej stronie dwuwarstwy lipidowej (rys. 14-15). Tak więc translokacyjny kanał ER jest bramkowany w dwóch kierunkach: musi się otwierać jak por łączący obie strony błony ER, a zarazem musi być zdolny do otwarcia się bocznego, aby przemieścić białko transbłonowe bezpośrednio do dwuwarstwy lipidowej. Jak już mówiono w rozdz. 11, białko transbłonowe raz wprowadzone do błony nie może zmienić swojej orientacji, która zostaje zachowana podczas wszelkich dalszych procesów powstawania i fuzji pęcherzyków.

W pewnych białkach transbłonowych do rozpoczęcia translokacji przez błonę używana jest sekwencja umieszczona na wewnętrznych, a nie końcowych odcinkach łańcucha polipeptydowego; sekwencja taka nie jest później usuwana. Taki system występuje w tych białkach transbłonowych, których łańcuch polipeptydowy przechodzi przez dwuwarstwę lipidową wielokrotnie. Uważa się, że w tych przypadkach hydrofobowe sekwencje sygnałowe działają parami: wewnętrzna sekwencja sygnałowa (*sekwencja start-transfer*) służy do rozpoczęcia translokacji, która trwa, aż nie sięgnie sekwencji stop-transfer — wtedy uwolnione zostają do dwuwarstwy lipidowej dwie sekwencje hydrofobowe tworzące α helisy (rys. 14-16). W białkach o bardziej złożonej topologii, które tworzą w dwuwarstwie wiele hydrofobowych α helis, działają dalsze pary sekwencji start i stop: każda sekwencja start wzna-



Rys. 14-16. Wbudowywanie w błonę ER białka transbłonowego o parzystych domenach hydrofobowych. Sekwencja sygnałowa kierująca do ER, ale umieszczona w dalszej niż końcowa części polipeptydu (kolor *czerwony*), działa jako sygnał rozpoczęcia translokacji i zapoczątkowuje przenoszenie łańcucha polipeptydowego. Gdy sekwencja stop-transfer (kotwicząca) (kolor *pomarańczowy*) wniknie do kanału translokacyjnego, kanał ten wyprowadza obie sekwencje w kierunku bocznym do dwuwarstwy lipidowej. Żadna z obu sekwencji nie jest odcinana, a cały łańcuch polipeptydowy zostaje zakotwiczony w błonie jako białko o parzystych domenach transbłonowych. Białka, które przenikają błonę więcej razy, zawierają dalsze pary sekwencji rozpoczęcia i zatrzymania translokacji; taki sam proces jest powtarzany dla każdej pary. [Ten sposób wbudowywania określa się często jako system spinki do włosów (ang. *hairpin* (*przyp. tłum.*)]

wia translokację dalszego odcinka łańcucha polipeptydowego, a każda sekwencja stop translokację tę kończy i przesuwa polipeptyd do dwuwarstwy. Tak więc białka przechodzące błonę wielokrotnie są „wszyte" w dwuwarstwę lipidową, tak jakby były wytworem maszyny tkackiej.

Po omówieniu drogi, jaką białka wchodzą do światła ER lub zostają wbudowane w błonę ER, rozważymy teraz, jak są one przenoszone dalej przez transport pęcherzykowy.

Pytanie 14-4

A. Spróbuj przewidzieć, jaką orientację przyjmie w błonie białko, które jest syntetyzowane z nie odcinaną, wewnętrzną sekwencją sygnałową (pokazaną na rys. 14-15 jako czerwona sekwencja rozpoczęcia translokacji), ale nie zawiera peptydu stop-transfer.

B. Spróbuj w podobny sposób przewidzieć, jaką orientację w błonie przyjmie białko, które jest syntetyzowane z odcinaną sekwencją sygnałową przy końcu N białka, po której następuje sekwencja rozpoczęcia translokacji.

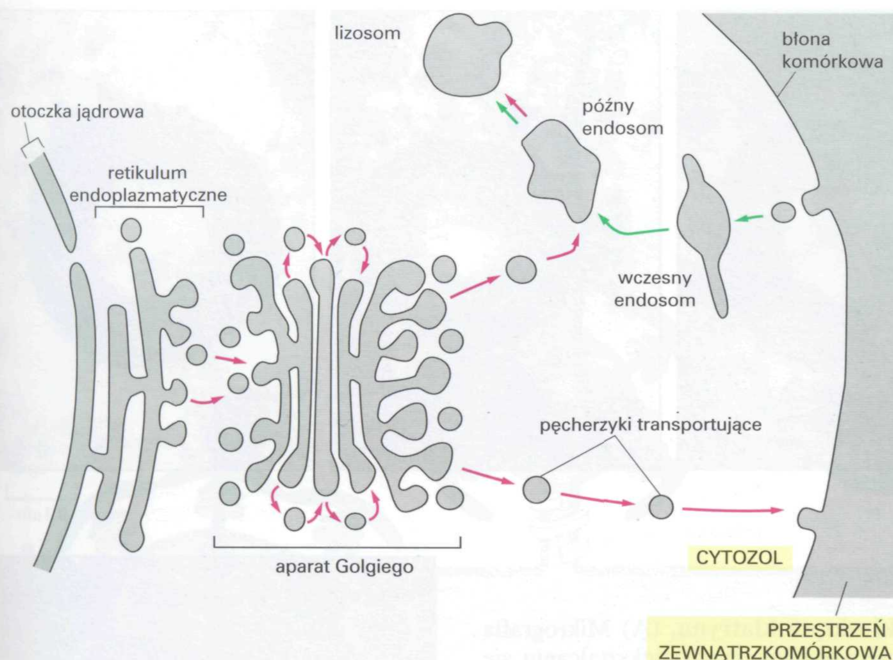
C. Jakie ustawienie sekwencji sygnałowych umożliwiłoby wbudowanie w błonę białka przechodzącego wielokrotnie, o nieparzystej liczbie segmentów transbłonowych?

Transport pęcherzykowy

Wniknięcie do ER jest zazwyczaj pierwszym etapem wędrówki białka do innego miejsca przeznaczenia, którym, przynajmniej początkowo, jest aparat Golgiego. Transport z ER do aparatu Golgiego i z aparatu Golgiego do innych przedziałów systemu błon wewnętrznych przebiega przez ciągłe pączkowanie i fuzję **pęcherzyków transportujących**. Drogi transportu prowadzonego przez pęcherzyki transportujące sięgają, idąc na zewnątrz, od ER do błony komórkowej, a idąc do wnętrza, od błony komórkowej do lizosomów, dostarczając w ten sposób dróg komunikowania się pomiędzy wnętrzem komórki a jej otoczeniem. W czasie gdy białka i lipidy są transportowane wzdłuż tych dróg na zewnątrz, wiele z nich ulega różnego typu modyfikacjom chemicznym, takim jak dodanie bocznych łańcuchów cukrowcowych (zarówno do białek, jak i lipidów) i powstawanie wiązań dwusiarczkowych (w białkach) stabilizujących strukturę białka.

Pęcherzyki transportujące przenoszą białka rozpuszczalne i błony między przedziałami

Ruch pęcherzyków między ograniczonymi przez błony przedziałami systemu błon wewnętrznych jest bardzo dobrze zorganizowany. Główna, idąca na zewnątrz *droga sekrecyjna* prowadzi od biosyntezy białek na błonie ER



Rys. 14-17. Przepływ pęcherzyków. Pozacytozolowa przestrzeń każdego oddzielonego błoną przedziału (kolor *szary*) pozostaje, jak pokazano, w łączności dzięki pęcherzykom transportującym. W skierowanej na zewnątrz drodze sekrecyjnej (*strzałki czerwone*) cząsteczki białka są transportowane z ER poprzez aparat Golgiego do błony komórkowej lub (poprzez późne endosomy) do lizosomów. W skierowanej do wnętrza komórki drodze endocytozy (*strzałki zielone*) cząsteczki zewnątrzkomórkowe są wchłaniane do pęcherzyków wyprowadzanych z błony komórkowej i są dostarczane do wczesnych endosomów, a potem (poprzez późne endosomy) do lizosomów

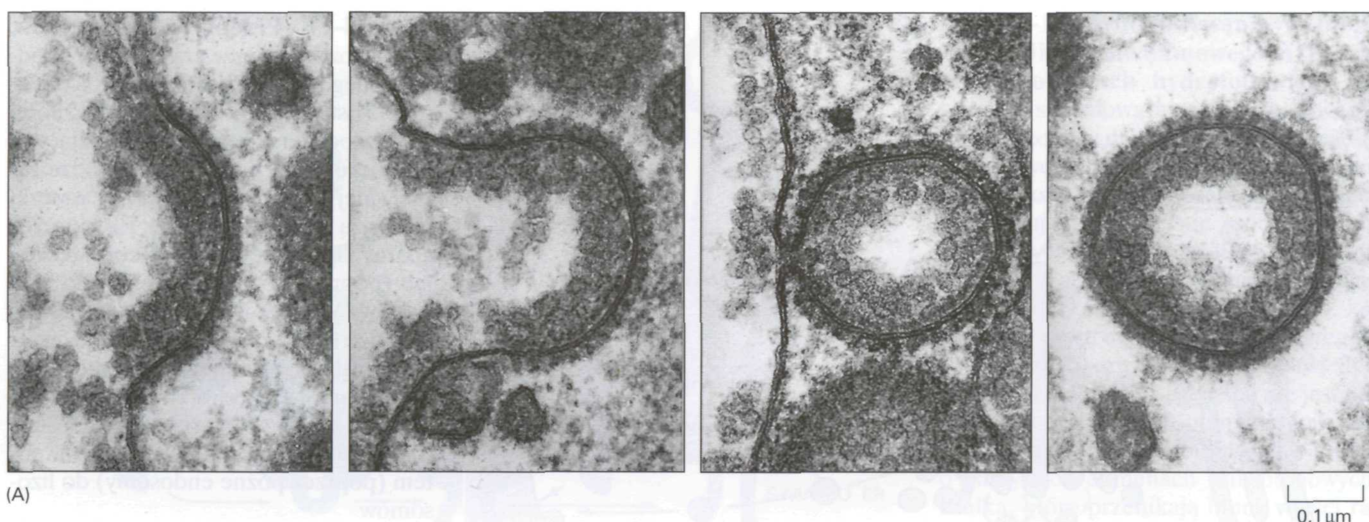
i ich wejścia do światła ER, poprzez aparat Golgiego, do powierzchni komórki; odgałęzienie od aparatu Golgiego prowadzi poprzez endosomy do lizosomów. Główna, prowadząca do wewnątrz *droga endocytozy*, odpowiedzialna za wchłanianie i degradację cząsteczek spoza komórki, prowadzi od błony komórkowej, poprzez endosomy, do lizosomów (rys. 14-17).

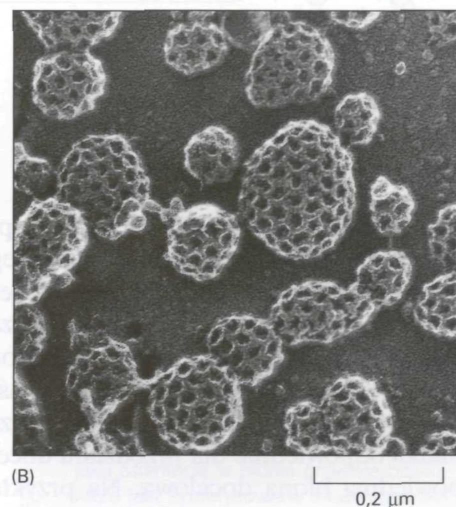
Aby przeprowadzić swą funkcję właściwie, każdy pęcherzyk transportujący, który odpączkowuje z danego przedziału, musi zabrać ze sobą tylko białka odpowiednie dla przedziału docelowego i musi ulec fuzji tylko z odpowiednią błoną docelową. Na przykład, pęcherzyk niosąc cargo (ładunek)* z aparatu Golgiego do błony komórkowej nie może przyjąć białek, które mają pozostać w aparacie Golgiego i może ulec fuzji tylko z błoną komórkową, a nie z błoną jakiejkolwiek innej organelli. Biorąc udział w tym ustawicznym przepływie składników błonowych, każda organella musi zachować swą własną odrębność, to jest swój własny wyróżniający skład białek i lipidów. Wszystkie te procesy rozpoznawania się zależą od białek związanych z błoną pęcherzyków transportujących. Jak zobaczymy, pomiędzy różnymi organellami wędrują w obu kierunkach różne typy pęcherzyków transportujących, z który każdy niesie odrębny zestaw cząsteczek.

Pączkowaniem pęcherzyków kieruje układ białek opłaszczających

Pęcherzyki odpączkowujące z błon mają zazwyczaj na swojej cytozolowej powierzchni charakterystyczny płaszcz białkowy i dlatego nazwano je **pęcherzykami opłaszczonymi**. Po ukończeniu pączkowania płaszcz zostaje utracony, co pozwala błonie pęcherzyka oddziaływać bezpośrednio z błoną, z którą ma się złączyć przez fuzję. Istnieje kilka rodzajów pęcherzyków opłaszczonych, różniących się składem białkowego płaszcza.

* Autor używa w oryginale „cargo". Redaktorzy uznali, że polski odpowiednik — ładunek — może być mylący ze względu na często omawiany w książce ładunek elektryczny. Dlatego też utrzymano termin cargo (*przyp. tłum.*).



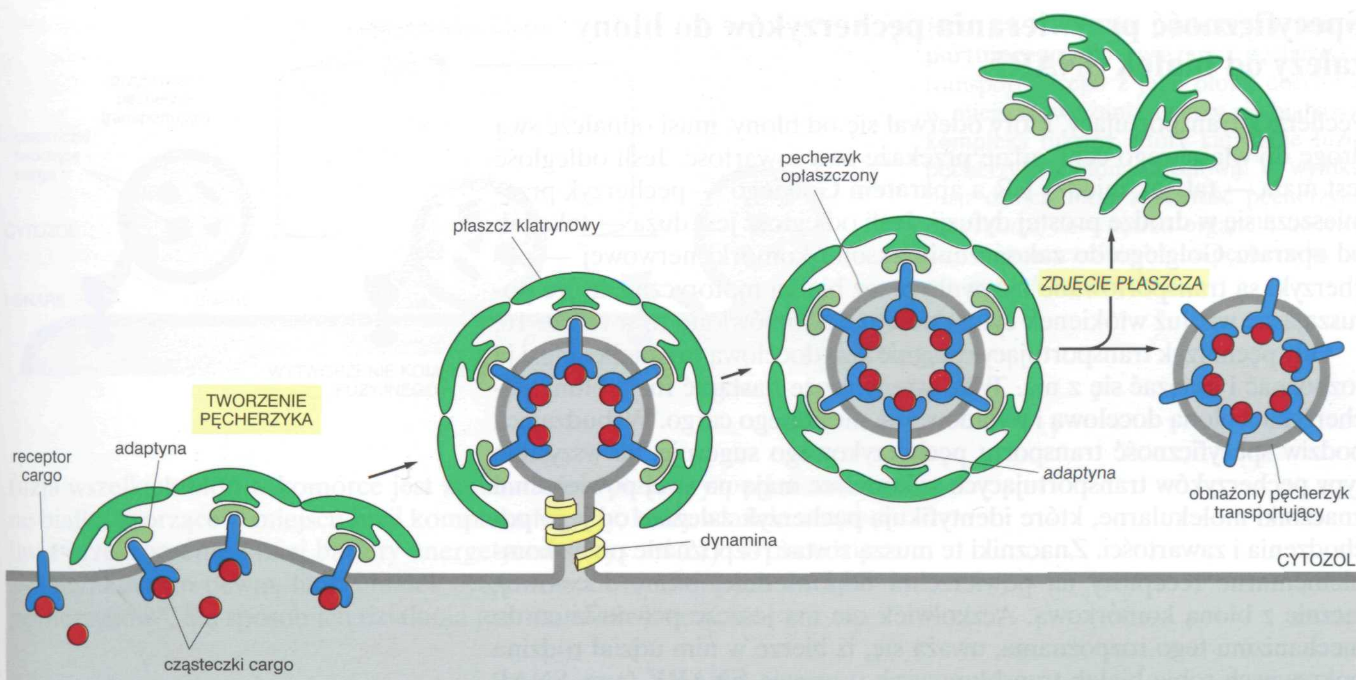


Rys. 14-18. Dołki i pęcherzyki okryte klatryną. (A) Mikrografia elektronowa ukazująca sekwencję wydarzeń przy przekształcaniu się dołka opłaszczonego klatryną w pęcherzyk opłaszczony klatryną. Pokazane tu dołki i pęcherzyki opłaszczone klatryną są niezwykle duże i powstały z błony komórkowej oocytu kury. Uczestniczą one w pobieraniu do oocytu cząstek złożonych z lipidów i białek, które będą użyte do utworzenia żółtka. (B) Mikrografia elektronowa ukazująca liczne dołki i pęcherzyki opłaszczone klatryną, odpączkowujące z wewnętrznej powierzchni błony komórkowej komórek skóry hodowanej *in vitro*. (A — dzięki uprzejmości: M. N. Perry, A. B. Gilbert, *J. Cell Sci.* 39: 257–272, 1979, za zgodą The Company of Biologist; B — z: J. Heuser, *J. Cell Biol.* 84: 560–583, 1980, za zgodą the Rockefeller University Press)

Uważa się, że płaszcz ma przynajmniej dwie funkcje: formowania błony przy tworzeniu pęcherzyka i współdziałania przy wychwytywaniu cząsteczek, które mają być dalej transportowane.

Najlepiej zbadane są pęcherzyki, których płaszcz tworzy głównie białko **klatryna;** są to *pęcherzyki okryte klatryną*. Odpączkowują one z aparatu Golgiego w skierowanej na zewnątrz drodze sekrecyjnej oraz z błony komórkowej w skierowanej do wewnątrz drodze endocytozy. Na przykład, przy błonie komórkowej każdy pęcherzyk powstaje początkowo jako *dołek opłaszczony klatryną*. Cząsteczki klatryny układają się na cytozolowej powierzchni błony w rodzaj koszyka, który kształtuje błonę w pęcherzyk (rys. 14-18). Wokół szyjki głęboko wpuklonej błony tworzy się pierścień z *dynaminy*, małego białka wiążącego GTP. Następnie dynamina hydrolizuje związany z nią GTP, co powoduje obciśnięcie pierścienia, a przez to oderwanie pęcherzyka od błony. W transporcie pęcherzykowym biorą również udział inne rodzaje pęcherzyków transportujących o odmiennych białkach opłaszczających. Powstają one w podobny sposób i przenoszą charakterystyczne dla siebie zestawy cząsteczek pomiędzy retikulum endoplazmatycznym, aparatem Golgiego i błoną komórkową. Mechanizm, jakim pęcherzyki transportujące selekcjonują swoje charakterystyczne cargo, poznano najlepiej w przypadku pęcherzyków opłaszczonych klatryną.

Sama klatryna nie odgrywa żadnej roli w wychwytywaniu specyficznych cząsteczek przeznaczonych do transportu. Funkcję tę w pęcherzykach opłaszczonych klatryną pełni odmienna klasa białek opłaszczających, o na-



zwie *adaptyny,* zarówno wiążących płaszcz z błoną pęcherzyka, jak i pomagających w selekcji cząsteczek, które mają być transportowane. Cząsteczki te niosą na sobie specyficzne *sygnały transportu*, które są rozpoznawane przez *receptory cargo* znajdujące się w błonie przedziału wyjściowego. Adaptyny pomagają w wychwyceniu specyficznych cząsteczek cargo przez przechwytywanie receptorów cargo, które wiążą te cząsteczki. W ten sposób wyselekcjonowany zestaw cząsteczek ładunku, związanych ze swoimi specyficznymi receptorami, zostaje wprowadzony do światła każdego nowo powstającego pęcherzyka opłaszczonego klatryną (rys. 14-19). Istnieją przynajmniej dwa typy adaptyn: te, które wiążą receptory cargo w błonie komórkowej, są odmienne od tych, które wiążą receptory cargo w aparacie Golgiego. Stanowi to odbicie różnic cargo niesionego przez pęcherzyki okryte klatryną z błony komórkowej od cargo niesionego przez pęcherzyki z aparatu Golgiego.

Odmienna klasa pęcherzyków opłaszczonych, o nazwie *pęcherzyki opłaszczone białkami COP*, bierze udział w przenoszeniu cząsteczek pomiędzy ER a aparatem Golgiego oraz między poszczególnymi strefami aparatu Golgiego (tab. 14-4).

Rys. 14-19. Selektywny transport za pośrednictwem pęcherzyków opłaszczonych klatryną. Receptory, które wiążą cząsteczki stanowiące cargo, są przechwycone przez adaptyny, wiążące zarazem cząsteczki klatryny do cytozolowej powierzchni pączkującego pęcherzyka. Wokół szyjki pączkującego pęcherzyka ustawiają się cząsteczki dynaminy; po skompleksowaniu hydrolizują one związany z nimi GTP i powodują oderwanie pęcherzyka. Po zakończeniu pączkowania białka płaszcza zostają usunięte i obnażony pęcherzyk może ulec fuzji z jego błoną docelową. Funkcjonalnie podobne białka opłaszczające występują w innych typach pęcherzyków opłaszczonych

Tabela 14-4. Pewne typy pęcherzyków opłaszczonych

Typ pęcherzyka opłaszczonego	Białka płaszcza	Pochodzenie	Przeznaczenie
Okryty klatryną	klatryna + adaptyna 1	aparat Golgiego	lizosom (poprzez endosomy)
Okryty klatryną	klatryna + adaptyna 2	błona komórkowa	endosomy
Okryte białkami COP	białka COP	ER cysterna Golgiego aparat Golgiego	aparat Golgiego cysterna Golgiego ER

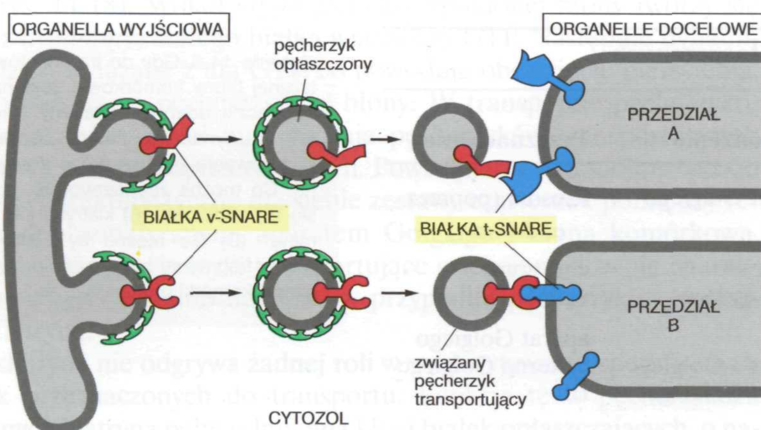
Pytanie 14-5. Gdy do fragmentów eukariotycznej błony komórkowej zostaną dodane cząsteczki adaptyny, klatryny i kompleksu GTP z dynaminą, można zaobserwować pączkowanie pęcherzyków okrytych klatryną. Co można zaobserwować, gdy opuści się (A) adaptynę, (B) klatrynę lub (C) dynaminę? (D) Co można by zaobserwować, gdyby fragmenty błony komórkowej pochodziły z komórki prokariotycznej?

Specyficzność przywierania pęcherzyków do błony zależy od białek SNARE

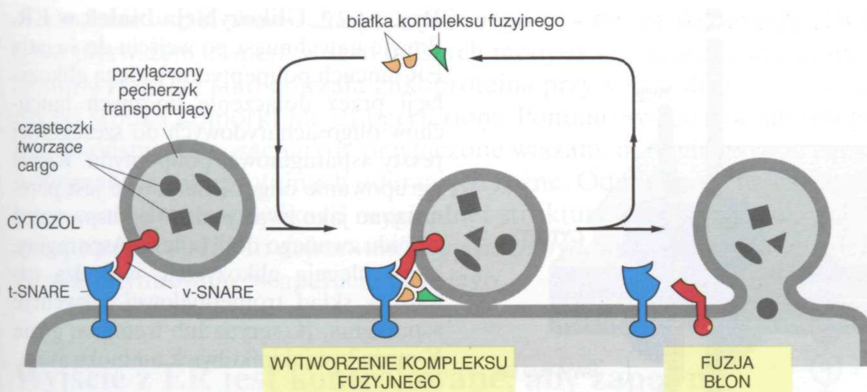
Pęcherzyk transportujący, który oderwał się od błony, musi odnaleźć swą drogę do właściwego celu, gdzie przekaże swą zawartość. Jeśli odległość jest mała — tak jak między ER a aparatem Golgiego — pęcherzyk przemieszcza się w drodze prostej dyfuzji. Jeśli odległość jest duża — taka jak od aparatu Golgiego do zakończenia aksonu komórki nerwowej — pęcherzyki są transportowane aktywnie przez białka motoryczne, które poruszają się wzdłuż włókienek cytoszkieletu, jak omówiono to w rozdz. 16.

Gdy pęcherzyk transportujący osiągnie swą docelową organellę, musi ją rozpoznać i związać się z nią. Tylko wtedy może nastąpić fuzja błony pęcherzyka z błoną docelową i wyładowanie niesionego cargo. Wzbudzająca podziw specyficzność transportu pęcherzykowego sugeruje, że wszystkie typy pęcherzyków transportujących w komórce mają na swej powierzchni znaczniki molekularne, które identyfikują pęcherzyk zależnie od jego pochodzenia i zawartości. Znaczniki te muszą zostać rozpoznane przez komplementarne receptory na powierzchni odpowiedniej błony docelowej, łącznie z błoną komórkową. Aczkolwiek nie ma jeszcze pewności co do mechanizmu tego rozpoznania, uważa się, iż bierze w nim udział rodzina pokrewnych sobie białek transbłonowych o nazwie **SNARE** (ang. SNAP receptors). Białka SNARE pęcherzyków (nazywane v-SNARE) są specyficznie rozpoznawane przez komplementarne białka SNARE na cytozolowej powierzchni błony docelowej (nazywane t-SNARE) (rys. 14-20). Uważa się, że każda organella i każdy typ pęcherzyka transportującego niesie specyficzne dla siebie białka SNARE, a poprawność fuzji pęcherzyka z właściwą błoną jest zapewniona oddziaływaniem pomiędzy komplementarnymi białkami SNARE.

Po rozpoznaniu przez pęcherzyk transportujący jego błony docelowej i przywarciu do niej, przekazanie ładunku do nowego przedziału wymaga fuzji pęcherzyka z błoną tego przedziału. Fuzja nie tylko dostarcza zawartość pęcherzyka do wnętrza docelowej organelli, ale również wbudowuje błonę pęcherzyka do błony organelli. Jednakże fuzja nie zawsze następuje zaraz po przywarciu obu błon i często musi oczekiwać na specyficzny sygnał uruchamiający. O ile przywarcie (dokowanie) wymaga tylko dostatecznego zbliżenia błon pozwalającego na interakcje białek wystających z dwóch dwuwarstw lipidowych, o tyle proces fuzji wymaga kontaktu znacznie bliższego, na odległość mniejszą niż 1,5 nm. Aby to nastąpiło, niezbędne jest usunięcie wody z hydrofilowych powierzchni błon, proces energetycznie bardzo niekorzystny. Jest więc wielce prawdopodobne, że



Rys. 14-20. Aktualny model wiązania pęcherzyków transportujących do błony docelowej. Pęcherzyki pączkujące z błony zawierają na swej powierzchni specyficzne białka znacznikowe o nazwie pęcherzykowe białka SNARE (v-SNARE), które wiążą komplementarnie docelowe białka SNARE (t-SNARE) na błonie docelowej. Uważa się, że liczne odmienne komplementarne pary białek v-SNARE i t-SNARE odgrywają kluczową rolę w kierowaniu pęcherzyków transportujących do ich odpowiednich błon docelowych



Rys. 14-21. Fuzja pęcherzyka transportującego. Po związaniu pęcherzyka transportującego z jego błoną docelową w miejscu związania tworzy się białkowy kompleks fuzyjny, który katalizuje fuzję pęcherzyka z błoną docelową. W wyniku fuzji dwóch błon zawartość pęcherzyka przechodzi do wnętrza organelli docelowej, a równocześnie błona pęcherzyka łączy się z błoną docelową

fuzja wszelkich błon w komórce jest katalizowana przez wyspecjalizowane białka tworzące w miejscu fuzji kompleks fuzyjny, który właśnie umożliwia przekroczenie takiej bariery energetycznej (rys. 14-21). Wprawdzie zidentyfikowano pewną liczbę białek cytozolowych niezbędnych do fuzji pęcherzyków*, ale sposób ich działania jest nadal nie znany.

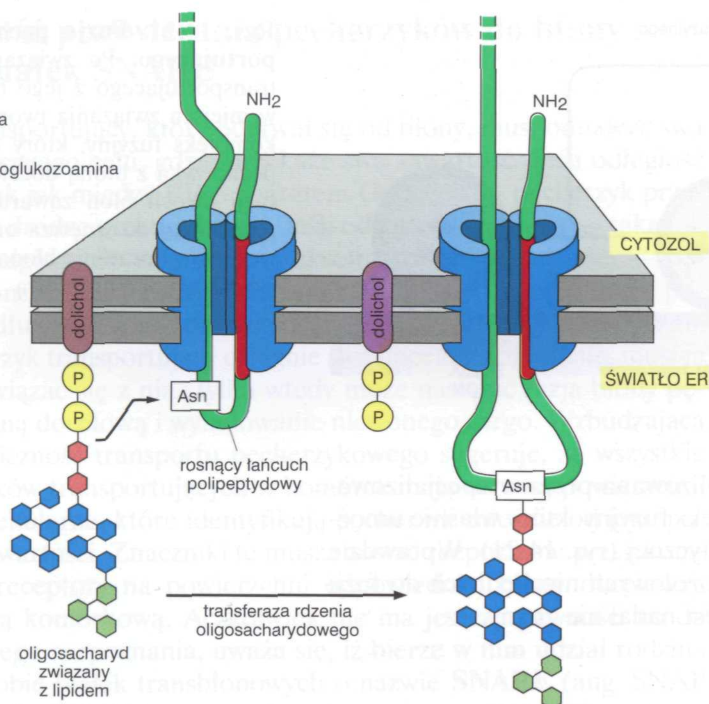
Drogi sekrecyjne

Ruch pęcherzyków nie ogranicza się do wnętrza komórki, ale sięga błony komórkowej lub od niej się zaczyna. Nowo powstałe białka, lipidy i cukrowce są dostarczane z ER, poprzez aparat Golgiego, do powierzchni komórki przez pęcherzyki transportujące, które ulegają fuzji z błoną komórkową w procesie **egzocytozy.** Każda cząsteczka, która wędruje tym szlakiem, przechodzi przez ustaloną kolejność przedziałów błonowych i jest często po drodze modyfikowana chemicznie. W tym podrozdziale prześledzimy drogę, jaką białka wędrują od ER, gdzie są tworzone i modyfikowane, poprzez aparat Golgiego, gdzie są dalej modyfikowane i sortowane, docierając w końcu do błony komórkowej. W czasie tej wędrówki z jednego przedziału do drugiego każde białko jest sprawdzane pod względem poprawnego sfałdowania i zestawienia z odpowiednimi partnerami tak, iż uwolnione na powierzchnię komórki zostają tylko białka poprawnie zbudowane, natomiast wszystkie inne zostają w komórce zdegradowane.

Większość białek ulega w ER kowalencyjnej modyfikacji

Większość białek jest po wejściu do ER modyfikowana chemicznie. Przez utlenienie par reszt cysteinowych tworzone są wiązania dwusiarczkowe (omówione w rozdz. 5), a reakcję tę prowadzi enzym znajdujący się w świetle ER. Wiązania dwusiarczkowe pomagają w stabilizacji struktury tych białek, które zarówno po wydzieleniu, jak i po wbudowaniu w błonę komórkową mogą na zewnątrz komórki napotkać enzymy degradujące lub być wystawione na zmiany pH. Wiązania dwusiarczkowe nie tworzą się w cytozolu, ponieważ panuje tam środowisko redukujące.

* Są to przynajmniej trzy białka SNAP i białko MSF (n-etyhl-maleimid sensitive factor = czynnik wrażliwy na n-etylomaleimid), które jest rozpuszczalną ATPazą (*przyp. tłum.*).



Rys. 14-22. Glikozylacja białek w ER. Prawie natychmiast po wejściu do światła ER łańcuch polipeptydowy ulega glikozylacji przez dołączenie bocznych łańcuchów oligosacharydowych do szczególnej reszty asparaginowej polipeptydu. Każde ugrupowanie oligosacharydowe jest przenoszone jako zwarty rdzeń na asparaginę z lipidu zwanego dolicholem. Asparaginy, które ulegają glikozylacji, wchodzą zawsze w skład trójpeptydowej sekwencji: asparagina, X, seryna lub treonina, gdzie X może być jakimkolwiek aminokwasem

Wiele białek wchodzących do światła ER lub do błony ER jest tam zamienianych w glikoproteiny, a to przez kowalencyjne przyłączenia krótkich bocznych łańcuchów oligosacharydowych. Ten proces *glikozylacji* jest prowadzony przez enzymy glikozylujące, znajdujące się w ER, a nieobecne w cytozolu; w cytozolu są glikozylowane tylko bardzo nieliczne białka i to wyłącznie przez przyłączenie pojedynczych reszt cukrów. Oligosacharydy przyłączone do białek pełnią różne funkcje zależnie od rodzaju białka. Mogą one ochraniać białko przed degradacją, przetrzymywać go w ER, dopóki nie zostanie ono właściwie sfałdowane, lub też pomagać we wprowadzeniu białka do odpowiedniej organelli, służąc jako sygnał transportowy przy pakowaniu danego białka do odpowiednich pęcherzyków transportujących (jak w przypadku białek lizosomowych, o czym będzie mowa później). Oligosacharydy, gdy znajdują się na powierzchni komórki, wchodzą w skład glikokaliksu, warstwy osłaniającej komórki (omówionej w rozdz. 11) i mogą działać w rozpoznawaniu jednej komórki przez inną, współtworząc tak zwany kod powierzchniowy komórki.

W obrębie ER boczne łańcuchy oligosacharydowe nie powstają przez kolejne dołączanie pojedynczych cukrów. Przeciwnie, do odpowiedniego miejsca na białku zostaje dołączone w całości rozgałęzione drzewko oligosacharydowe zawierające 14 cukrów. Oligosacharydy są początkowo przyłączane do tkwiącego w błonie ER bardzo specyficznego lipidu o nazwie *dolichol* i dopiero później przeniesione do amidowej grupy asparaginowej reszty białka, natychmiast gdy ta reszta wyłoni się do światła ER podczas translokacji białka (rys. 14-22). Dołączenie tego oligosacharydu zachodzi w pojedynczej reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzym błonowy (transferaza oligosacharyd–białko), którego miejsce aktywne jest eksponowane w błonie ER od strony światła; to wyjaśnia, dlaczego białka cytozolowe nie są glikozylowane tą drogą. O tym, która reszta asparaginy w białku przyjmie oligosacharyd, decyduje prosta sekwencja trzech aminokwasów; jednym z nich jest sama asparagina. Takie przyłączenie łańcuchów grup oligosacharydowych do grupy NH_2 asparaginy w białku określa się jako *wiązanie N-glikozydowe*; jest ono najczęstszym typem wiązania występującym w glikoproteinach.

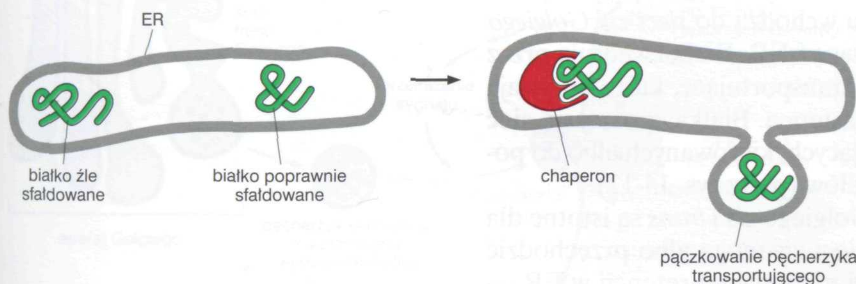
Dodanie w ER oligosacharydu złożonego z 14 reszt cukrowcowych jest tylko pierwszym etapem w serii dalszych modyfikacji, której ulega białko, zanim wyłoni się jako dojrzała glikoproteina przy końcu drogi prowadzącej od środka komórki ku jej peryferiom. Pomimo swego początkowego podobieństwa oligosacharydy przyłączone wiązaniem *N*-glikozydowym są w dojrzałych glikoproteinach uderzająco różne. Odmienność ta jest wynikiem rozległych modyfikacji oryginalnej struktury prekursorowej, pokazanej na rys. 14-22. To *dojrzewanie oligosacharydów* rozpoczyna się w ER i jest kontynuowane w aparacie Golgiego.

Pytanie 14-6. Dlaczego dodanie do białka w ER całej już złożonej grupy 14 reszt cukrowych może być korzystniejsze niż stopniowe dobudowywanie łańcuchów cukrowych na powierzchni białka przez sekwencyjne dodawanie cukrów przez poszczególne enzymy?

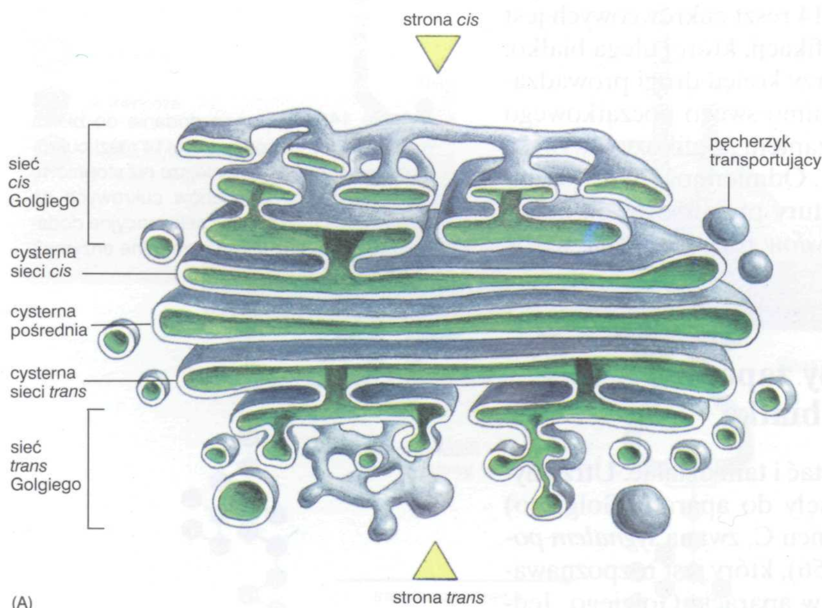
Wyjście z ER jest kontrolowane, aby zapewnić poprawną jakość wyprowadzanego białka

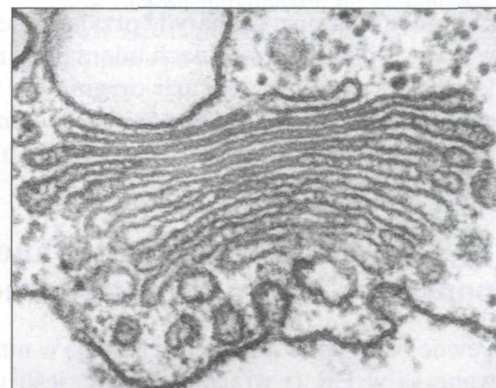
Pewne białka powstające w ER mają w nim zostać i tam działać. Utrzymywane są w ER (i wracają do ER, jeśli umknęły do aparatu Golgiego) przez czteroaminokwasową sekwencję przy końcu C, zwaną *sygnałem pozostawania (retencji) w ER* (patrz tab. 14-3, s. 456), który jest rozpoznawany przez błonowe białko receptorowe w ER i w aparacie Golgiego. Jednak większość białek wchodzących do ER jest przeznaczona do innych miejsc; są one pakowane w pęcherzyki transportujące, które odpączkowują z ER i ulegają fuzji z aparatem Golgiego, przy czym wyjście z ER jest wysoce selektywne. Pojedyncze białka nieprawidłowo sfałdowane lub białka dimerowe bądź multimerowe, które nie wytworzyły poprawnego oligomeru, pozostają aktywnie przytrzymane w ER przez związanie z białkowymi chaperonami znajdującymi się w świetle ER. Integracja z chaperonami przytrzymuje białka w ER aż do uzyskania odpowiedniego sfałdowania (rys. 14-23); jeśli ono nie nastąpi, białka ulegną degradacji. Na przykład, cząsteczki przeciwciał są tworzone z czterech łańcuchów polipeptydowych (patrz panel 5-3, s. 158–159), które w ER układają się w kompletną cząsteczkę przeciwciała. Przeciwciała złożone tylko częściowo zostają zatrzymane w ER, dopóki nie połączą się wszystkie cztery łańcuchy polipeptydowe; każda cząsteczka przeciwciała nie ułożona w kompleks ulega w końcu degradacji. W ten sposób ER kontroluje jakość białek, które eksportuje do aparatu Golgiego.

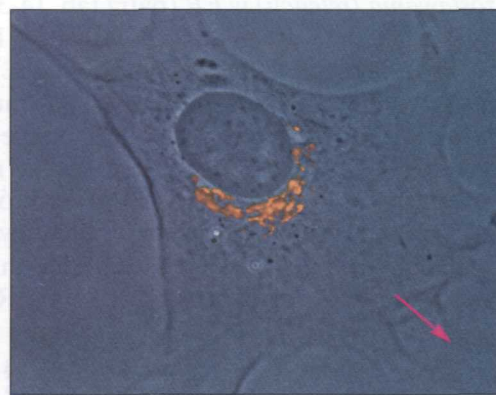
Jednakże czasem ten mechanizm kontroli jakości może być dla organizmu szkodliwy. Na przykład, główna mutacja wywołująca powszechną chorobę genetyczną, *mukowiscydozę*, prowadzi do powstania białka transportowego błony komórkowej, które jest nieco źle sfałdowane; chociaż białko takie funkcjonowałoby zupełnie prawidłowo, gdyby dotarło do błony komórkowej, zostaje przez ten brak perfekcji zatrzymane w ER, co powoduje tragiczne konsekwencje. Rozwija się wyniszczająca choroba, której powodem nie jest inaktywacja ważnego białka przez mutację, ale odrzucenie tego białka przez komórkę na niższym piętrze transportu, zanim dano mu okazją do działania.



Rys. 14-23. Kontrola jakości w ER. *Białka źle sfałdowane wiążą się w świetle* ER z chaperonami i przez to są tam zatrzymywane, natomiast białka sfałdowane poprawnie są przenoszone w pęcherzykach transportujących do aparatu Golgiego. Jeśli źle sfałdowane białka nie potrafią sfałdować się poprawnie, są transportowane do cytozolu, gdzie ulegają degradacji







Rys. 14-24. Aparat Golgiego. (A) Trójwymiarowa rekonstrukcja stosu Golgiego uzyskana z mikrografii elektronowych aparatu Golgiego zwierzęcej komórki wydzielniczej. (B) Mikrografia elektronowa stosu Golgiego z komórki roślinnej, w której aparat ten jest strukturą szczególnie wyróżniającą się; aparat Golgiego jest zorientowany tak jak w (A). (C) Aparat Golgiego hodowanego fibroblastu wybarwiony fluoryzującym przeciwciałem, które specyficznie znakuje ten aparat. *Strzałka czerwona* wskazuje kierunek przemieszczania się komórki. Należy zwrócić uwagę, że aparat Golgiego znajduje się blisko jądra, a jego orientacja jest zgodna z kierunkiem przemieszczania się komórki. (A — przerysowane z: A. Rambourg, Y. Clermont, *Eur. J. Cell Biol.* 51: 189–200, 1990; B — dzięki uprzejmości: George Pallade; C — dzięki uprzejmości: John Henley, Mark McNiven)

Białka są dalej modyfikowane i sortowane w aparacie Golgiego

Aparat Golgiego jest zazwyczaj umieszczony blisko jądra komórkowego, a w komórkach zwierzęcych także blisko centrosomu. Stanowi zbiór spłaszczonych woreczków błonowych (*cystern*) ułożonych jak stos talerzy. Każdy taki stos zawiera 3–20 cystern (rys. 14-24). Ilość stosów Golgiego w komórce jest bardzo zmienna i zależy od typu komórki; niektóre zawierają tylko jeden duży stos, inne zaś setki małych stosów.

Każdy stos Golgiego ma dwie różne strony: wejściową, czyli *cis*, i wyjściową, czyli *trans*. Strona *cis* jest zorientowana ku ER, natomiast strona *trans* — ku błonie komórkowej. Najbardziej zewnętrzna cysterna każdej strony jest częścią sieci powiązanych między sobą błonowych rurek i pęcherzyków (rys. 14-24A). Rozpuszczalne białka i błona wchodzą do *sieci cis Golgiego* poprzez pęcherzyki transportujące pochodzące z ER. Białka wędrują przez cysterny sekwencyjnie, poprzez pęcherzyki transportujące, które odrywają się od jednej cysterny i łączą przez fuzję z następną. Białka opuszczają **sieć *trans* Golgiego** w pęcherzykach transportujących, kierowanych albo do powierzchni komórki, albo do innych przedziałów (patrz rys. 14-17).

Uważa się, że obie brzeżne sieci strefy Golgiego *cis* i *trans* są istotne dla sortowania białek. Białka wchodzące do sieci *cis* mogą albo przechodzić dalej przez cysterny Golgiego, albo — jeśli mają sygnał retencji w ER —

powrócić do ER. Białka występujące w strefie *trans* są sortowane według swego przeznaczenia albo do lizosomów, albo do powierzchni komórki. O pewnych przykładach sortowania przez sieci *trans* Golgiego będziemy mówić później.

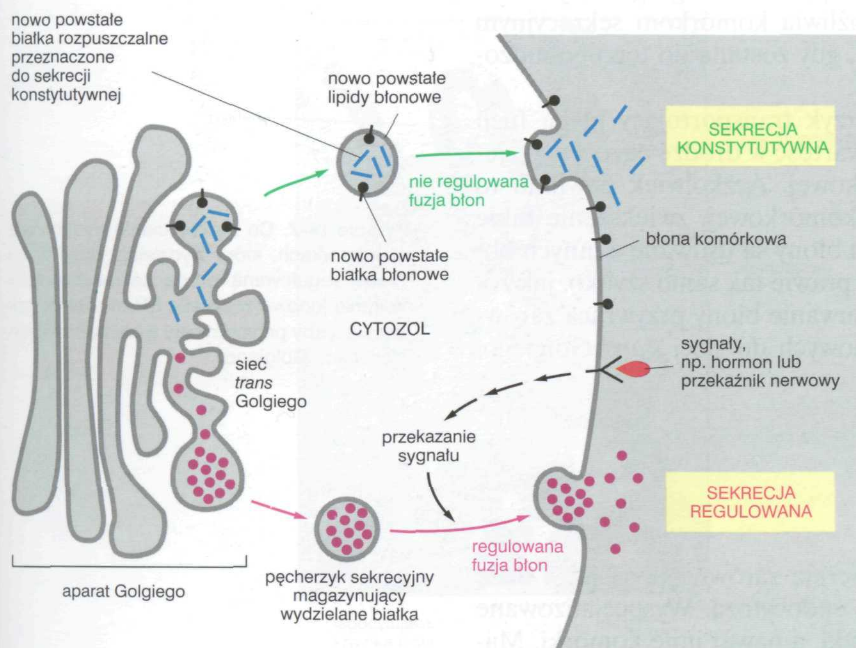
Wiele grup oligosacharydowych dodanych do białek w ER ulega dalszym modyfikacjom w aparacie Golgiego. Na przykład, na pewnych białkach tworzone są złożone łańcuchy oligosacharydowe, powstające w wielu uporządkowanych procesach, w których cukry są dodawane i usuwane przez serię enzymów, działających w ściśle wyznaczonej sekwencji w trakcie przechodzenia białka przez stosy Golgiego. Istnieje wyraźna korelacja między pozycją enzymu w łańcuchu wydarzeń a ich umiejscowieniem w cysternach Golgiego: enzymy, które działają wcześnie, występują w cysternach bliskich stronie *cis*, natomiast enzymy działające później występują w cysternach bliskich stronie *trans*.

Białka sekrecyjne są uwalniane z komórki w drodze egzocytozy

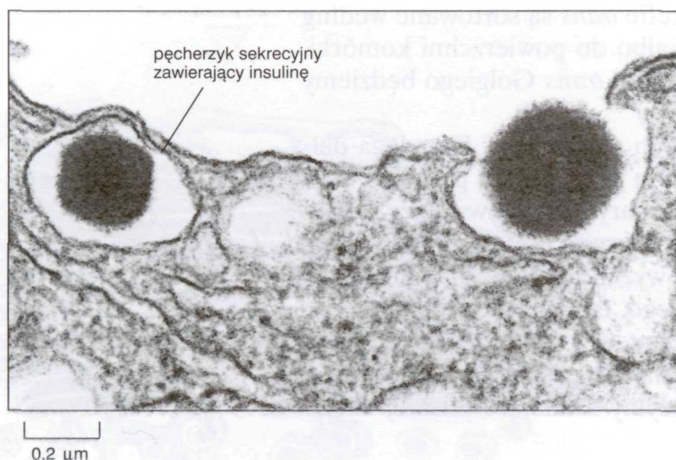
We wszystkich komórkach eukariotycznych zachodzi stały przepływ pęcherzyków, które pączkują z sieci *trans* Golgiego i ulegają fuzji z błoną komórkową.

Ten *szlak konstytutywnej egzocytozy* działa w sposób ciągły i dostarcza nowo powstałe lipidy i białka do błony komórkowej; jest to droga zapewniająca wzrost błony komórkowej w czasie powiększania się komórek przed ich podziałem. Niesie ona również — w procesie **wydzielania (sekrecji)**, do powierzchni komórki białka, które mają być wydzielone na zewnątrz. Pewne wydzielone białka przywierają do powierzchni komórki i stają się peryferycznymi białkami błony komórkowej, niektóre są wbudowywane w substancję międzykomórkową, a jeszcze inne dyfundują do płynu międzykomórkowego, aby odżywiać inne komórki lub stanowić dla nich sygnały.

Poza drogą konstytutywnej egzocytozy działającej we wszystkich komórkach eukariotycznych w sposób ciągły, istnieje *droga egzocytozy regulowanej*, która funkcjonuje tylko w komórkach wyspecjalizowanych w se-



Rys. 14-25. Regulowana i konstytutywna droga egzocytozy. Obie drogi rozchodzą się w sieci *trans* Golgiego. Liczne białka rozpuszczalne są wydzielane w sposób ciągły konstytutywną drogą sekrecyjną, która działa we wszystkich komórkach. Droga ta dostarcza także nowo powstałe białka i lipidy do błony komórkowej. W wyspecjalizowanych komórkach wydzielniczych działa również regulowana droga egzocytozy, w której wybrane białka przechodzą z sieci *trans* Golgiego do pęcherzyków sekrecyjnych, gdzie są zagęszczane i magazynowane do momentu otrzymania sygnału stymulującego ich wydzielenie



Rys. 14-26. Egzocytoza pęcherzyków sekrecyjnych. Mikrografia elektronowa ukazuje wydzielenie insuliny z pęcherzyka sekrecyjnego z komórki β trzustki do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Insulina jest magazynowana w każdym pęcherzyku sekrecyjnym w formie bardzo zagęszczonej, a uwalniana jest tylko po otrzymaniu przez komórkę sygnału, którym jest zwiększenie stężenia glukozy we krwi. (Dzięki uprzejmości: Lelio Orci, z L. Orci, J-D Vassali, A. Perrelet; *Sci. Am.* 256: 85–94, 1988)

krecji. Wyspecjalizowane *komórki wydzielnicze* wytwarzają duże ilości szczególnych produktów, takich jak hormony, śluz lub enzymy trawienne, które są magazynowane w **pęcherzykach wydzielniczych (sekrecyjnych)**. Pęcherzyki te odpączkowują z sieci *trans* Golgiego i nagromadzają się w pobliżu błony komórkowej. Ulegają one fuzji z błoną komórkową i uwalniają swą zawartość na zewnątrz tylko wtedy, gdy komórka zostanie pobudzona przez sygnał zewnątrzkomórkowy (rys. 14-25). Na przykład, wzrost stężenia glukozy we krwi jest dla komórek trzustki sygnałem do wydzielenia hormonu insuliny (rys. 14-26).

Białka przeznaczone do pęcherzyków sekrecyjnych są sortowane i pakowane w sieci *trans* Golgiego. Białka wędrujące tą drogą mają specjalne właściwości powierzchniowe wywołujące ich agregację w warunkach jonowych panujących w sieci *trans* Golgiego (środowisko kwaśne i wysoki poziom Ca^{2+}). Zagregowane białka są rozpoznawane przez nieznany mechanizm i pakowane do pęcherzyków sekrecyjnych, które odrywają się od strefy *trans*. Białka wydzielane w drodze konstytutywnej nie agregują i dlatego są automatycznie przenoszone do błony komórkowej przez pęcherzyki transportujące drogi konstytutywnej. Selektywna agregacja pozwala na gęste upakowanie białek sekrecyjnych w pęcherzykach wydzielniczych, do stężeń 200 razy większych niż stężenie niezagregowanych białek w świetle cystern Golgiego. To umożliwia komórkom sekrecyjnym szybkie wydzielenie wielkich ilości białka, gdy zostaną do tego pobudzone (patrz rys. 14-26).

Gdy pęcherzyk sekrecyjny lub pęcherzyk transportujący ulega fuzji z błoną komórkową i wyładowuje swą zawartość w drodze egzocytozy, jego błona staje się częścią błony komórkowej. Aczkolwiek powinno to znacznie zwiększyć powierzchnię błony komórkowej, zwiększenie takie jest tylko przejściowe, ponieważ składniki błony są usuwane z innych obszarów powierzchni w drodze endocytozy prawie tak samo szybko, jak zostały one dodane przez egzocytozę. To usuwanie błony przywraca zarówno lipidy, jak i białka pęcherzyków błonowych do sieci *trans* Golgiego, gdzie mogą być użyte ponownie.

Pytanie 14-7. Co według ciebie wydarzy się w komórkach, które wydzielają duże ilości białka regulowaną drogą sekrecyjną, jeśli warunki jonowe w świetle ER można by tak zmienić, aby przypominały warunki w świetle sieci *trans* Golgiego?

Drogi endocytozy

Komórki eukariotyczne ustawicznie pobierają zarówno płyn, jak i duże oraz małe cząsteczki w procesie zwanym endocytozą. Wyspecjalizowane komórki mogą także wchłaniać duże cząstki, a nawet inne komórki. Ma-

teriał, który ma być wchłonięty, jest stopniowo otaczany małym wycinkiem błony komórkowej, która początkowo wpukla się do środka, a następnie odrywa, tworząc wewnątrzkomórkowy *pęcherzyk endocytotyczny* (*endocytarny*). Wchłonięty materiał zostaje ostatecznie dostarczony do lizosomów, gdzie ulega strawieniu, a powstałe metabolity przechodzą z lizosomu bezpośrednio do cytozolu, gdzie mogą być użyte przez komórkę.

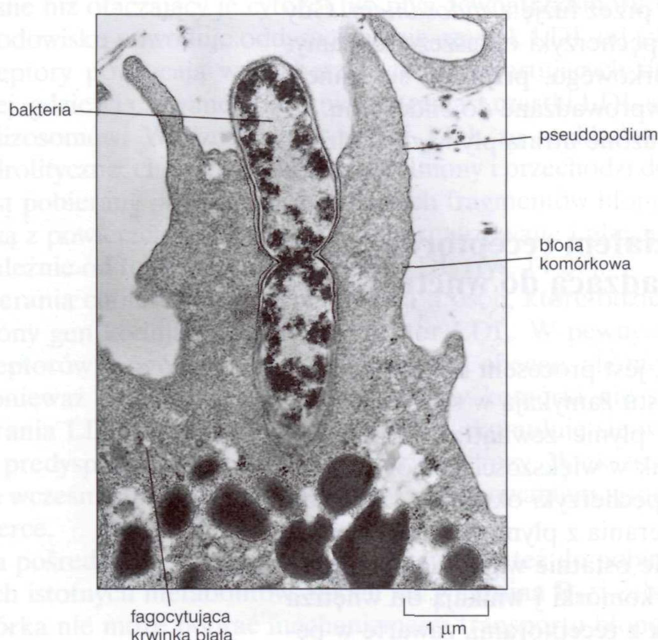
Wyróżnia się dwa główne typy endocytozy na podstawie wielkości powstających pęcherzyków endocytotycznych. *Pinocytoza* („picie przez komórkę") — to wchłanianie płynu i cząsteczek przez małe pęcherzyki (o średnicy < 150 nm). *Fagocytoza* („jedzenie przez komórkę") — to wchłanianie dużych cząstek, np. mikroorganizmów i szczątków komórkowych, przez duże pęcherzyki, *fagosomy* (o średnicy w zasadzie > 250 nm). O ile wszystkie komórki eukariotyczne ustawicznie wchłaniają płyn i cząsteczki przez pinocytozę, o tyle duże cząstki są wchłaniane głównie przez wyspecjalizowane *komórki fagocytujące*, np. fagocyty.

Zajmiemy się tu prześledzeniem drogi endocytozy od błony komórkowej do lizosomów, rozpoczynając od pobierania dużych cząstek w procesie fagocytozy.

Wyspecjalizowane komórki fagocytujące wchłaniają duże cząstki

Najbardziej wyrazistą formą endocytozy jest **fagocytoza,** którą obserwowano już od ponad stu lat. U pierwotniaków fagocytoza jest formą pobierania pokarmu; duże cząstki, np. bakterie, są pobierane do fagosomów, które następnie łączą się przez fuzję z lizosomami, gdzie cząstki pokarmu ulegają strawieniu. W organizmach wielokomórkowych tylko nieliczne komórki mogą wchłaniać duże cząstki. W jelicie zwierząt duże cząstki pokarmowe muszą zostać najpierw rozłożone przez enzymy zewnątrzkomórkowe do pojedynczych cząsteczek, zanim będą mogły być pobrane przez komórki absorpcyjne, wyścielające jelito.

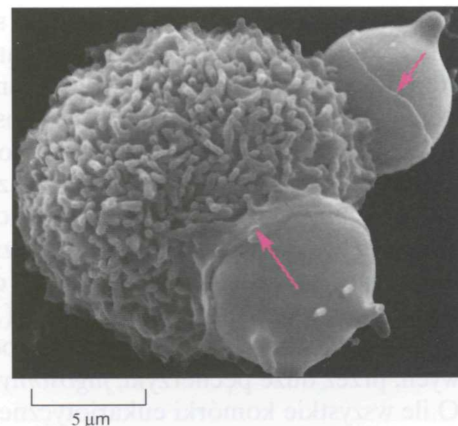
Niemniej jednak, fagocytoza jest u większości zwierząt procesem ważnym dla celów innych niż odżywianie. Najbardziej wydajnie jest prowadzona przez **komórki fagocytujące**, takie jak *makrofagi*, szeroko rozpo-



Rys. 14-27. Fagocytowanie bakterii przez krwinkę białą. Mikrografia elektronowa fagocytującej krwinki białej (neutrofilu), wchłaniającej bakterię znajdującą się w procesie podziału. Wysunięte wypustki krwinki białej — pseudopodia — stopniowo otaczają bakterię. (Dzięki uprzejmości: Dorothy F. Bainton)

wszechnione w tkankach i pewne krwinki białe. Komórki fagocytujące bronią nas przed infekcją, wchłaniając atakujące mikroorganizmy. Aby jakaś cząstka została wchłonięta przez makrofaga lub krwinkę białą, musi wpierw zostać związana do powierzchni komórki fagocytującej i uaktywnić jeden z wielu receptorów powierzchniowych. Pewne receptory rozpoznają przeciwciała, białka, które chronią nas przed infekcją, wiążąc się z powierzchnią mikroorganizmów. Związanie do tych receptorów bakterii pokrytych przeciwciałami indukuje w komórce fagocytującej wysuwanie płatowatych wypustek błony komórkowej, zwanych *pseudopodia*, które otaczają bakterie (ryc. 14-27) i łączą się na swoich końcach tworząc *fagosom*.

Komórki fagocytujące odgrywają również ważną rolę w usuwaniu martwych i uszkodzonych komórek oraz szczątków komórkowych. Na przykład makrofagi wchłaniają każdego dnia ponad 10^{11} naszych zużytych erytrocytów (rys. 14-28).



Rys. 14-28. Fagocytowanie erytrocytów przez makrofaga. Skaningowa mikrografia elektronowa makrofaga fagocytującego dwa erytrocyty. *Strzałki czerwone* wskazują krańce delikatnych płatów błony — pseudopodiów — wysuwanych przez makrofaga, które mając kształt kołnierzy wchłaniają erytrocyty. (Dzięki uprzejmości: Jean Paul Revel)

Płyn i makrocząsteczki są pobierane na drodze pinocytozy

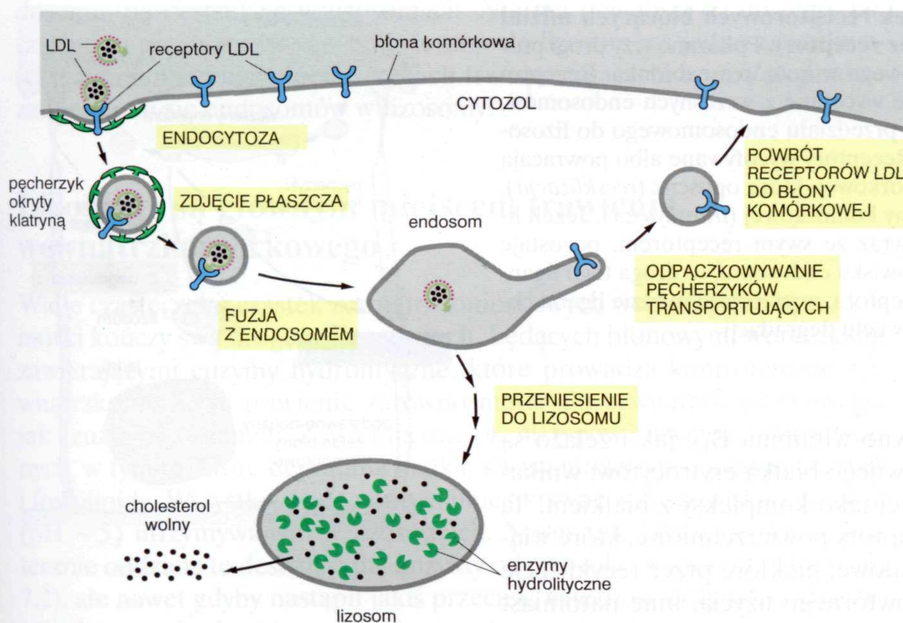
Komórki eukariotyczne ustawicznie wciągają małe fragmenty swojej błony komórkowej w postaci drobnych pęcherzyków pinocytotycznych, które później wracają do powierzchni komórki. Szybkość, z jaką błona komórkowa jest internalizowana przez **pinocytozę,** różni się w zależności od typu komórki, ale jest zazwyczaj zaskakująco duża.

Na przykład makrofag w każdej godzinie wchłania ilość płynu odpowiadającą 25% jego własnej objętości. Oznacza to, że wchłania on co minuta 3% swojej błony komórkowej, co odpowiada wchłonięciu 100% błony w ciągu pół godziny. Endocytoza u fibroblastów przebiega nieco wolniej, ale z kolei pewne fagocytujące ameby wchłaniają swą błonę komórkową jeszcze szybciej. Ponieważ całkowita powierzchnia i objętość komórki pozostają podczas tego procesu nie zmienione, jest oczywiste, że tyle samo błony jest dodawane do powierzchni komórki przez fuzję pęcherzyków przy egzocytozie, ile jest usuwanych w drodze endocytozy.

Pinocytoza jest zazwyczaj przeprowadzana przez dołki i pęcherzyki opłaszczone klatryną, o których mówiliśmy już wcześniej (patrz rys. 14-18, 14-19). Po oderwaniu się od błony komórkowej pęcherzyki okryte klatryną szybko zrzucają swój płaszcz i łączą się przez fuzję z *endosomem*. Gdy dołki opłaszczone po inwaginacji tworzą pęcherzyki opłaszczone, zamykają w sobie część płynu zewnątrzkomórkowego, przez co substancje w nim rozpuszczone są internalizowane i wprowadzane do endosomu. To pobieranie płynu jest w zasadzie zrównoważone utratą płynu zachodzącą podczas egzocytozy.

Endocytoza przebiegająca z udziałem receptorów stanowi specyficzną drogę prowadzącą do wnętrza komórek zwierzęcych

Pinocytoza, tak jak ją dopiero co opisano, jest procesem niedyskryminującym. Pęcherzyki endocytotyczne po prostu zamykają w sobie jakiekolwiek cząsteczki przypadkowo obecne w płynie zewnątrzkomórkowym i przenoszą je do wnętrza komórki. Jednak w większości komórek zwierzęcych pinocytoza prowadzona poprzez pęcherzyki okryte klatryną stanowi równocześnie efektywną drogę pobierania z płynu zewnątrzkomórkowego specyficznych makrocząsteczek. Te ostatnie wiążą się z komplementarnymi receptorami na powierzchni komórki i wnikają do wnętrza komórki jako kompleksy makrocząsteczek z receptorami, zawarte w pę-



Rys. 14-29. Pobieranie cząstek LDL w drodze endocytozy kierowanej receptorami. LDL wiąże się z receptorami na powierzchni komórki i ulega internalizacji w pęcherzykach okrytych klatryną. Pęcherzyki tracą swój płaszcz i ulegają fuzji z endosomami. W kwaśnym środowisku tych ostatnich cząstki LDL oddysocjowują od swych receptorów. Gdy LDL kończy swą wędrówkę w lizosomach, gdzie jest degradowany uwalniając cholesterol, receptory LDL powracają poprzez pęcherzyki transportujące do błony komórkowej, gdzie są użyte ponownie. Dla uproszczenia pokazano tylko jeden receptor dla LDL wchodzący do komórki i wracający do błony komórkowej. Receptor LDL niezależnie od tego, czy jest związany z cząstką LDL, czy wolny, zamyka swą wędrówkę poprzez komórkę zazwyczaj w ciągu 10 minut, co odpowiada kilku *setkom takich wędrówek* w ciągu życia receptora trwającego ok. 20 godzin

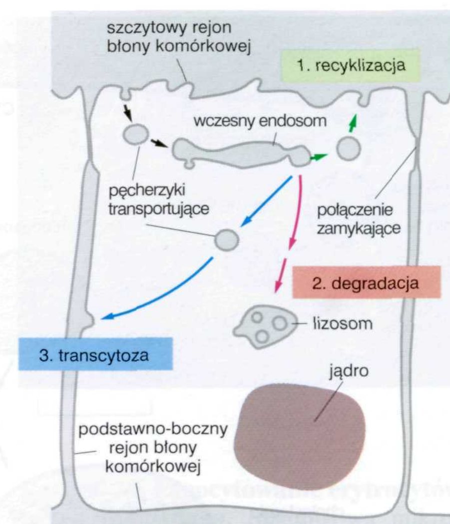
cherzykach zamkniętych klatryną. Proces ten — nazywany **endocytozą kierowaną receptorami** — stanowi selektywny mechanizm zagęszczający, który w porównaniu ze zwykłą pinocytozą zwiększa ponad 1000 razy wydajność internalizowania określonych makrocząsteczek. W konsekwencji nawet te składniki płynu zewnątrzkomórkowego, które występują w niewielkim stężeniu, mogą być wchłonięte bez pobierania odpowiednio dużej ilości płynu zewnątrzkomórkowego. Ważnym przykładem endocytozy kierowanej przez receptory w komórkach zwierzęcych jest pobieranie cholesterolu, potrzebnego do wzrostu błon.

Cholesterol jest bardzo trudno rozpuszczalny i transportowany w krwiobiegu w postaci związanej z białkami jako cząstki o nazwie *lipoproteiny o małej gęstości*, czyli *LDL* (ang. **l**ow-**d**ensity **l**ipoproteins). Cząstki LDL wiążą się z receptorami umieszczonymi na powierzchni komórki, a tak powstałe kompleksy są wchłaniane na drodze endocytozy kierowanej przez receptory i doprowadzane do **endosomów.** Wnętrze endosomów jest bardziej kwaśne niż otaczający je cytozol lub płyn zewnątrzkomórkowy i to kwaśne środowisko powoduje oddysocjowanie cząstek LDL od ich receptorów. Receptory powracają w pęcherzykach transportujących do błony komórkowej, gdzie są używane ponownie, natomiast cząstki LDL są dostarczane do lizosomów. W lizosomach cząstki LDL są rozkładane przez enzymy hydrolityczne; cholesterol zostaje uwolniony i przechodzi do cytozolu, skąd jest pobierany podczas syntezy nowych fragmentów błony. Receptory LDL są z powierzchni komórki stale internalizowane i ulegają recyklizacji, niezależnie od tego, czy są związane z LDL (rys. 14-29).

Ta droga pobierania cholesterolu jest przerwana u osób, które odziedziczyły uszkodzony gen kodujący białkowy receptor LDL. W pewnych przypadkach receptorów w ogóle brakuje, a w innych są obecne, ale niefunkcjonalne. Ponieważ w każdym z tych przypadków komórki nie są zdolne do pobierania LDL, u osób takich cholesterol akumuluje się we krwi, powodując predyspozycję do powstania arteriosklerozy. Większość tych osób umiera wcześnie na zawał, powodowany zaczopowaniem tętnic zaopatrujących serce.

Endocytoza za pośrednictwem receptorów jest używana też do pobierania wielu innych istotnych metabolitów, takich jak witamina B_{12} i żelazo, których komórka nie może pobrać mechanizmami transportu błono-

Rys. 14-30. Możliwe losy białek receptorowych biorących udział w endocytozie kierowanej przez receptory. Pokazano trzy drogi prowadzące z przedziału endosomowego w komórce nabłonka. Receptory, które nie zostały specyficznie wycofane z wczesnych endosomów, przechodzą drogą prowadzącą z przedziału endosomowego do lizosomów, gdzie ulegają degradacji. Receptory wycofywane albo powracają do tej samej domeny błony komórkowej, którą opuściły (*recyklizacja*), albo do odmiennych domen błony komórkowej (*transcytoza*). Jeżeli ligand, który uległ endocytozie wraz ze swym receptorem, pozostaje z nim związany w kwaśnym środowisku endosomu, to droga tego liganda będzie identyczna z drogą receptora; w przeciwnym razie ligand będzie dostarczony do lizosomów w celu degradacji



wego, omówionymi w rozdz. 12. Zarówno witamina B_{12}, jak i żelazo są niezbędne do syntezy hemoglobiny, głównego białka erytrocytów; wnikają one do niedojrzałej krwinki czerwonej jako kompleksy z białkiem. Tą drogą są wchłaniane również liczne receptory powierzchniowe, które wiążą zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe; niektóre przez recyklizację powracają do błony komórkowej do powtórnego użycia, inne natomiast są degradowane w lizosomach. Niestety, endocytoza przebiegająca za pomocą receptorów może być wykorzystana przez wirusy; tą drogą wchodzą do komórki wirusy grypy, a także wirus HIV powodujący AIDS.

Makrocząsteczki doprowadzone przez endocytozę są sortowane w endosomach

Ponieważ materiał zewnątrzkomórkowy pobrany w drodze pinocytozy jest szybko przenoszony do endosomów, przedział endosomów można uwidocznić w mikroskopie elektronowym inkubując uprzednio żywe komórki w płynie zawierającym znacznik gęsty elektronowo. Załadowany w ten sposób przedział endosomów ma wygląd złożonego zespołu połączonych ze sobą cewek błonowych i większych pęcherzyków. Stosując takie doświadczalne ładowanie można wyróżnić dwa zespoły endosomów. Cząsteczki znacznikowe pojawiają się najpierw w *endosomach wczesnych*, tuż pod błoną komórkową, a po 5–15 minutach w *endosomach późnych*, w pobliżu jądra. Wnętrze przedziału tworzonego przez endosomy ma odczyn kwaśny (pH 5–6) dzięki działaniu w błonach tych organelli protonowej ATPazy transportującej, która pompuje H^+ z cytozolu do światła endosomów.

Przedział utworzony przez endosomy jest głównym miejscem sortowania na prowadzącej do wnętrza komórki drodze endocytozy, tak jak sieć *trans* Golgiego pełni tę funkcję w prowadzącej na zewnątrz drodze sekrecyjnej. Kwaśne środowisko w endosomach odgrywa kluczową rolę w procesie sortowania, zmuszając wiele receptorów do uwolnienia związanego z nimi cargo. Drogi, którymi będą wędrowały receptory po wejściu do endosomów, różnią się w zależności od typu receptora: 1) większość wraca do tej samej domeny błony komórkowej, z której przybyły, jak to jest w przypadku receptora LDL omówionego wcześniej; 2) pewne wędrują do lizosomów, gdzie ulegają degradacji; a 3) niektóre są przemieszczane do odmiennych domen błony komórkowej, przenosząc przez to swoje cargo cząsteczek z jednej przestrzeni zewnątrzkomórkowej do drugiej — w procesie zwanym *transcytozą* (rys. 14-30).

Cząsteczki cargo, które pozostają związane ze swoimi receptorami, dzielą los tych receptorów. Te, które oddysocjowują od swoich receptorów w endosomie, są skazane, wraz z większością zawartości światła en-

Pytanie 14-8. Żelazo (Fe) jest istotnym metalem śladowym, potrzebnym wszystkim komórkom. Jest ono na przykład niezbędne do syntezy hemu, który jest częścią miejsca aktywnego wielu enzymów biorących udział w transporcie elektronów; jest ono również potrzebne w hemoglobinie, głównym białku erytrocytów. Komórki pobierają żelazo na drodze endocytozy kierowanej przez receptory. System pobierania żelaza ma dwie składowe: rozpuszczalne białko o nazwie transferyna, które krąży w krwiobiegu, oraz receptor transferyny, który podobnie jak receptor LDL (rys. 14-29) jest białkiem transbłonowym, ulegającym ciągłej endocytozie i recyklizacji do błony komórkowej. Jony żelaza wiążą się z transferyną w pH neutralnym, ale nie w kwaśnym. Transferyna łączy się ze swym receptorem w neutralnym pH tylko wtedy, gdy zawiera związany jon żelaza, natomiast w kwaśnym pH wiąże się z receptorem nawet przy braku związanego żelaza. Znając te właściwości opisz, jak jest pobierane żelazo i omów korzyści wynikające z tego skomplikowanego schematu.

dosomu, na destrukcję w lizosomach. Nie ma pewności co do tego, jak cząsteczki przenoszone są z endosomów do lizosomów; jedną z możliwości jest przenoszenie w pęcherzykach transportujących, a inną stopniowe zamienianie się endosomów w lizosomy.

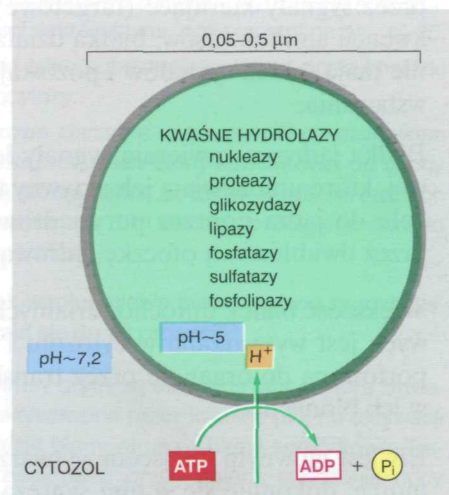
Lizosomy są głównym miejscem trawienia wewnątrzkomórkowego

Wiele cząsteczek i cząstek zewnątrzkomórkowych wchłoniętych przez komórki kończy swą drogę w **lizosomach,** będących błonowymi woreczkami zawierającymi enzymy hydrolityczne, które prowadzą kontrolowane wewnątrzkomórkowe trawienie zarówno materiału zewnątrzkomórkowego, jak i zużytych organelli. Zawierają one ok. 40 typów enzymów hydrolitycznych, w tym te, które degradują białka, kwasy nukleinowe, oligosacharydy i fosfolipidy. Wszystkie one są optymalnie aktywne w środowisku kwaśnym (pH ~5) utrzymywanym w lizosomach. Normalnie błona lizosomu skutecznie oddziela te destrukcyjne enzymy od cytozolu (w którym pH jest ok. 7,2), ale nawet gdyby nastąpił jakiś przeciek, zależność enzymów od dużego zakwaszenia chroni zawartość cytozolu przed uszkodzeniem.

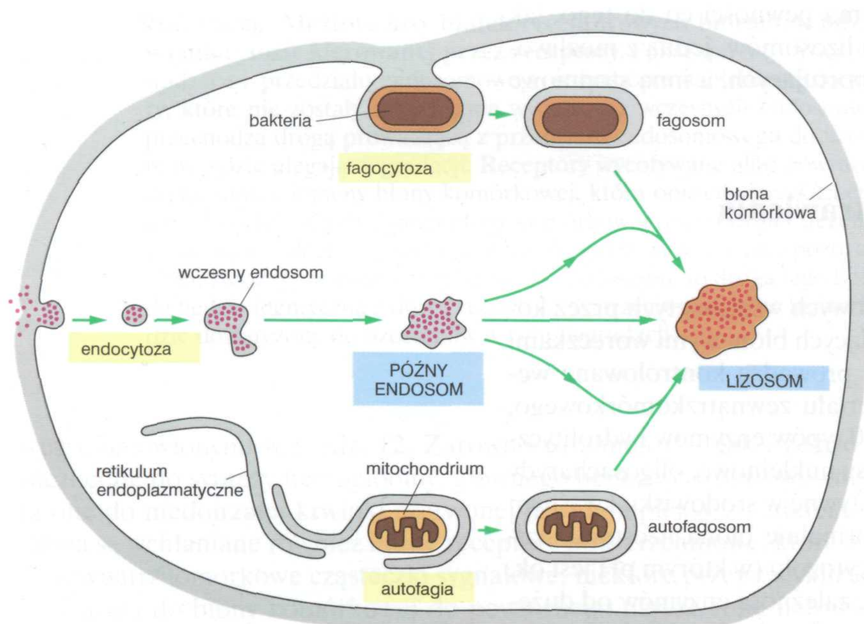
Podobnie jak inne organelle komórkowe, lizosomy mają zarówno specyficzny zestaw enzymów, jak i specyficzną błonę ograniczającą. Błona lizosomów zawiera białka transportujące, które umożliwiają przeniesienie końcowych produktów trawienia makrocząsteczek, takich jak aminokwasy, cukry i nukleotydy — do cytozolu, gdzie mogą być użyte przez komórkę lub skąd mogą być wydalone poza obręb komórki. Błona ta, podobnie jak błona endosomów, zawiera ATPazę transportującą H^+, która pompuje H^+ do wnętrza lizosomu, podtrzymując kwaśne pH jego wnętrza (rys. 14-31). Większość białek błony lizosomu jest niezwykle silnie glikozylowana, a cukry, które pokrywają większość powierzchni białek skierowanych do światła lizosomu, ochraniają te białka przed strawieniem przez proteazy lizosomowe.

Wyspecjalizowane enzymy trawienne i białka błon lizosomu są syntetyzowane w ER i transportowane przez aparat Golgiego do jego sieci *trans*. Podczas pobytu w ER i sieci *cis* Golgiego enzymy zostają oznakowane specyficzną ufosforylowaną grupą cukrową (mannozo-6-fosforan) tak, iż dochodząc do sieci *trans* Golgiego są rozpoznawane przez odpowiedni receptor mannozo-6-fosforanu, a przez to wysortowane i upakowane do pęcherzyków transportujących, które odpączkowują i dostarczają swą zawartość do lizosomów poprzez późne endosomy (patrz rys. 14-17).

W zależności od swego pochodzenia materiały docierają do lizosomów różnymi drogami. Zobaczyliśmy, że cząstki zewnątrzkomórkowe są pobierane do fagosomów, które ulegają fuzji z lizosomami, oraz że płyn zewnątrzkomórkowy i makrocząsteczki są pobierane do mniejszych pęcherzyków biorących udział w endocytozie i dostarczających swą zawartość do lizosomów poprzez endosomy. Komórki mają również dodatkową drogę dostarczania materiałów do lizosomów, używaną do degradacji zużytych części samej komórki. Na przykład na mikrografiach elektronowych komórek wątroby widzi się często lizosomy trawiące mitochondria, a także inne organelle. Proces rozpoczyna się prawdopodobnie otoczeniem or-



Rys. 14-31. Lizosom. Kwaśne hydrolazy są enzymami hydrolitycznymi, które są aktywne w środowisku kwaśnym. Kwaśne środowisko światła lizosomu jest utrzymywane działaniem błonowej H^+ ATPazy, pompującej H^+ z cytozolu do światła tej organelli



Rys. 14-32. Trzy drogi prowadzące do degradacji w lizosomach. Każda z dróg prowadzi do wewnątrzkomórkowego trawienia materiałów pochodzących z różnych źródeł. Przedziały powstające w przebiegu tych trzech dróg można czasem rozróżnić morfologicznie i od tego pochodzą ich nazwy „autofagolizosom", „fagolizosom" itd. Jednakże jedyną różnicę w tych lizosomach stanowi sam trawiony materiał

ganelli przez błony pochodzące z ER, co tworzy *autofagosom,* który następnie ulega fuzji z lizosomem (rys. 14-32); nie wiadomo, co jest znacznikiem organelli przeznaczonej do zniszczenia.

Streszczenie

- Komórki eukariotyczne zawierają liczne organelle błonowe, w tym jądro, retikulum endoplazmatyczne (ER), aparat Golgiego, lizosomy, endosomy, mitochondria, chloroplasty (w komórkach roślinnych) i peroksysomy.
- Nowe organelle błonowe powstają w komórce przez powiększanie się, a następnie podział.
- Większość białek organelli powstaje w cytozolu i jest do nich transportowana.
- Białka te są doprowadzane do właściwej organelli przez sygnały kierujące (targetowe), zawarte w sekwencji aminokwasów; białka działające w cytozolu nie mają takich sygnałów i pozostają w miejscu powstawania.
- Białka jądrowe zawierają sygnały lokalizacji jądrowej, które umożliwiają ich aktywny transport z cytozolu do jądra poprzez pory jądrowe przechodzące przez dwubłonową otoczkę jądrową.
- Większość białek mitochondrialnych i chloroplastowych jest wytwarzana w cytozolu i aktywnie transportowana do organelli przez translokazy białkowe w ich błonach.
- ER jest głównym miejscem wytwarzania błon w komórce; dokonuje się w nim synteza większości lipidów i wielu białek. Białka są tworzone na rybosomach związanych z powierzchnią szorstkiego ER.
- Rybosomy są kierowane z cytozolu do ER, jeśli białka na nich tworzone zawierają sekwencję kierującą do ER, wykrywaną w cytozolu przez cząstkę rozpoznającą sygnał (SRP). Związanie kompleksu rybosom–SRP do jego receptora na błonie ER rozpoczyna proces translokacji, w którym rosnący polipeptyd przechodzi jak nitka poprzez kanał translokacyjny w błonie ER.
- Białka rozpuszczalne przeznaczone do sekrecji lub umiejscowienia w świetle organelli przechodzą całkowicie do światła ER, natomiast białka transbłonowe przeznaczone do błony ER i innych błon komórki zostają zakotwiczone w dwuwarstwie lipidowej przez jedną lub więcej transbłonowych α helis.
- W świetle ER białka fałdują się, kompleksują z innymi białkami, tworzą wiązania dwusiarczkowe i przyłączają łańcuchy oligosacharydowe.
- Wyjście z ER jest ważnym etapem kontroli jakości; białka, które nie sfałdują się poprawnie lub nie skompleksują ze swymi normalnymi partnerami, są zatrzymywane w ER i w końcu degradowane.
- Białko transportowane z ER do aparatu Golgiego i stamtąd do innych miejsc przeznaczenia jest przemieszczane przez pęcherzyki transportujące, które ustawicznie odpączkowują z jednej błony i ulegają

fuzji z inną błoną w procesie zwanym transportem pęcherzykowym.

- Pączkujące pęcherzyki transportujące mają na swej cytozolowej powierzchni specyficzne białka płaszcza; zmontowanie płaszcza jest siłą napędzającą proces pączkowania, a białka płaszcza pomagają we włączeniu do powstającego pęcherzyka receptorów i związanego z nimi cargo cząsteczek. Wkrótce po odpączkowaniu pęcherzyki okryte płaszczem tracą swój płaszcz białkowy, co umożliwia im złączenie się i dokonanie fuzji z odpowiednią błoną docelową; uważa się, że w złączeniu tym biorą udział białka receptorowe v-SNARE i t-SNARE, fuzja zaś jest katalizowana przez białka cytozolowe tworzące w miejscu złączenia kompleks fuzyjny.
- Aparat Golgiego otrzymuje z ER nowo utworzone białka, modyfikuje ich oligosacharydy, sortuje białka i rozprowadza je z sieci *trans* Golgiego do błony komórkowej, lizosomów lub pęcherzyków sekrecyjnych.
- We wszystkich komórkach eukariotycznych pęcherzyki transportujące ustawicznie odpączkowują z sieci *trans* Golgiego i ulegają fuzji z błoną komórkową w procesie zwanym egzocytozą konstytutywną. Doprowadza to lipidy i białka błonowe do powierzchni komórki i uwalnia z komórki cząsteczki w procesie zwanym sekrecją.
- Wyspecjalizowane komórki sekrecyjne mają również regulowaną drogę egzocytozy, w której cząsteczki zmagazynowane w pęcherzykach sekrecyjnych zostają uwolnione z komórki przez egzocytozę dopiero wtedy, gdy komórka otrzyma sygnał do sekrecji.
- Komórki wchłaniają płyn, cząsteczki, a czasem nawet cząstki w drodze endocytozy, podczas której pewne obszary błony komórkowej ulegają inwaginacji i przez odpączkowanie tworzą pęcherzyki endocytotyczne.
- Duża część materiału pobranego na zasadzie endocytozy jest dostarczana do endosomów, a następnie do lizosomów, gdzie ulega degradacji działaniem enzymów hydrolitycznych; natomiast większość składników błony pęcherzyków powstających w endocytozie ulega — poprzez pęcherzyki transportujące — recyklizacji do błony komórkowej i jest ponownie używana.

Hasła

aparat Golgiego
cytozol
egzocytoza
endocytoza z udziałem receptorów
endosom
fagocytoza
klatryna
komórki fagocytujące
lizosom
organelle błonowe
otoczka jądrowa
pęcherzyki opłaszczone
pęcherzyki sekrecyjne (wydzielnicze)
pęcherzyki transportujące
pinocytoza
por jądrowy
retikulum endoplazmatyczne
sekrecja (wydzielanie)
sekwencja sygnałowa
sieć *trans* Golgiego
SNARE
szorstkie retikulum endoplazmatyczne

Pytania

Pytanie 14-9. Które z następujących twierdzeń są poprawne? Wyjaśnij swoje odpowiedzi.

A. Rybosomy są strukturami cytoplazmatycznymi, które podczas syntezy białka zostają połączone przez cząsteczkę mRNA w polirybosomy.

B. Sekwencja aminokwasów Leu-His-Arg-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Lys-Leu-Ser-Ser jest sekwencją sygnałową kierującą białka do ER.

C. Wszystkie pęcherzyki transportujące w komórce muszą zawierać w swej błonie białka v-SNARE.

D. Pęcherzyki transportujące dostarczają białka i lipidy do powierzchni komórki.

E. Gdyby dostarczanie przyszłych białek lizosomowych z sieci *trans* Golgiego do późnych endosomów zostało zablokowane, to białka lizosomowe zostałyby wydzielone konstytutywnymi drogami sekrecyjnymi, pokazanymi na rys. 14-25.

F. Lizosomy trawią tylko substancje pobrane przez komórki w drodze endocytozy.

G. Łańcuchy cukrowe złączone wiązaniem *N*-glikozydowym występują w glikoproteinach błony komórkowej od strony jej zewnętrznej powierzchni, a także w glikoproteinach skierowanych do światła ER i sieci *trans* Golgiego oraz do matriks mitochondrialnej.

Pytanie 14-10. Jak według ciebie białka mające sygnał eksportu z jądra dostają się do tej organelli?

Pytanie 14-11. Wirusy grypy są otoczone błoną, która zawiera białko fuzyjne aktywowane przez kwaśne pH. Po aktywacji białko powoduje fuzję błony wirusa z błoną komórkową. Tradycyjny zwyczaj zwalczenia grypy poleca spędzenie nocy w stajni. Aczkolwiek może to brzmieć dziwnie, jest w tym pier-

wiastek racjonalny; powietrze w stajni zawiera amoniak wytwarzany przez bakterie z moczu końskiego. Naszkicuj diagram pokazujący szczegóły drogi, którą wirus grypy wnika do komórek, i pomyśl, jak NH_3 może ochronić komórki przed infekcją. (Wskazówka: NH_3 może zneutralizować kwaśne roztwory w drodze reakcji $NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$).

Pytanie 14-12. Zastanów się nad białkami v-SNARE, które kierują pęcherzyki transportujące z sieci *trans* Golgiego do błony komórkowej. Podobnie jak wszystkie inne v-SNARE, są one białkami błonowymi, które wchodzą podczas swej biosyntezy do błony ER i są następnie przenoszone pęcherzykami transportującymi do ich miejsc przeznaczenia. Tak więc pęcherzyki transportujące, pączkujące z ER, zawierają przynajmniej dwa rodzaje białek v-SNARE — te, które kierują pęcherzyki do cystern *cis* Golgiego, i te, które przechodzą tranzytem do sieci *trans* Golgiego, gdzie będą pakowane do odmiennych pęcherzyków transportujących, przeznaczonych do błony komórkowej. (A) Dlaczego może to stanowić problem? (B) Zaproponuj sposoby, jakimi komórka mogłaby go rozwiązać.

Pytanie 14-13. Szczególny typ mutanta *Drosophila* zostaje sparaliżowany przy podwyższeniu temperatury. Mutacja wpływa na strukturę dynaminy tak, że jest ona inaktywowana w wysokiej temperaturze. Właściwie, funkcje dynaminy wykryto analizując defekty w tych właśnie mutantach muszki owocowej. Całkowity paraliż przy podwyższonej temperaturze sugeruje, że zablokowaniu uległo przekaźnictwo synaptyczne między komórką mięśniową a nerwową (co omówiono w rozdz. 12). Zaproponuj, dlaczego przekazywanie sygnałów w synapsie może wymagać dynaminy. Co — na podstawie swojej hipotezy — spodziewałbyś się zobaczyć na mikrografiach elektronowych synapsy takich mutantów muszek, wystawionych na działanie podwyższonej temperatury?

Pytanie 14-14. Jeśli stwierdzisz, że to potrzebne, przeredaguj następujące twierdzenia, aby stały się prawdziwe: „Ponieważ sekwencje jądrowej lokalizacji białek nie są odcinane przez proteazy po imporcie białka do jądra, mogą one być ponownie użyte do importowania białek jądrowych po mitozie, kiedy to białka cytozolowe i jądrowe ulegają wymieszaniu. Kontrastuje to z losem sekwencji sygnałowych kierujących do ER, które — gdy tylko wejdą do światła ER — zostają odcięte przez peptydazy sygnałów. Dlatego też sekwencje sygnałowe kierujące do ER nie mogą być powtórnie użyte do importowania białek do ER po mitozie, kiedy to białka cytozolowe i białka ER zostały wymieszane; stąd też te białka ER muszą ulec degradacji i resyntezie."

Pytanie 14-15. Zastanów się nad białkiem, które zawiera sekwencję sygnałową kierującą do ER na swoim końcu N, a sekwencję kierującą do jądra — w swoim środku. Jaki według ciebie będzie los tego białka? Wyjaśnij swą odpowiedź.

Pytanie 14-16. Porównaj i przeciwstaw sobie import białka do ER i do jądra. Wymień przynajmniej dwie główne różnice w działających mechanizmach i zastanów się, dlaczego mechanizm importu do ER może nie działać przy imporcie do jądra i odwrotnie.

Pytanie 14-17. Podczas mitozy otoczka jądrowa rozpada się na małe pęcherzyki i białka wewnątrzjądrowe ulegają całkowitemu wymieszaniu z białkami cytozolowymi. Czy jest to zgodne ze schematem ewolucyjnym zaproponowanym na rys. 14-3?

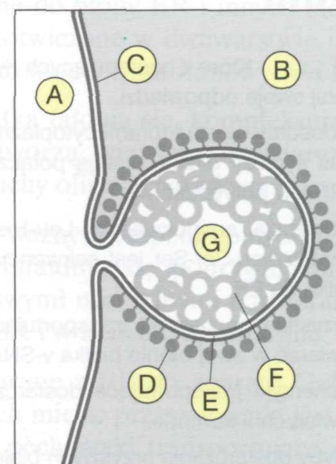
Pytanie 14-18. Białko, które hamuje pewne enzymy proteolityczne (proteazy), jest normalnie wydzielane przez komórki wątroby do krwiobiegu. Białko to — inhibitor trypsyny — jest nieobecne w krwiobiegu pacjentów, którzy są nosicielami mutacji polegającej na zmianie pojedynczego aminokwasu w białku. Brak inhibitora trypsyny jest źródłem różnych poważnych schorzeń, zwłaszcza w tkance płucnej, a to ze względu na nie kontrolowaną aktywność proteaz. Jest rzeczą zaskakującą, że gdy zmutowany inhibitor trypsyny zostaje zsyntetyzowany laboratoryjnie, jest równie aktywny jak prawidłowy inhibitor trypsyny. Dlaczego więc mutacja wywołuje chorobę? Pomyśl o kilku możliwościach i zasugeruj sposoby, które pozwoliłyby te możliwości rozróżnić.

Pytanie 14-19. Za powód do sławy pani dr Outonalimb uważa odkrycie przez siebie forgetyny, głównego białka wytwarzanego w szyszynce młodzieży. Białko to powoduje selektywną krótkotrwałą nieodpowiedzialność i utratę pamięci, np. wtedy gdy układ słuchowy odbiera hasło takie jak „proszę wynieść śmieci!". Według hipotezy tej autorki forgetyna (białko „zapomnienia") przy końcu C ma hydrofobową sekwencję sygnałową kierującą do ER, która jest rozpoznawana przez SRP i powoduje translokację tego białka poprzez błonę ER mechanizmem pokazanym na rys. 14-13. Autorka twierdzi, że białko jest wydzielane z szyszynki do krwiobiegu, skąd wywiera dewastujące skutki systemowe. Jesteś członkiem komitetu, który ma zdecydować, czy autorka powinna otrzymać grant do dalszego sprawdzania swej hipotezy. Pamiętaj, że recenzja grantu powinna być uprzejma i konstruktywna.

Pytanie 14-20. Idąc krok dalej w zakresie ewolucyjnego schematu przedstawionego na rys. 14-3 zaproponuj, jak mógł ewolucyjnie powstać aparat Golgiego. Narysuj prosty diagram ilustrujący twój pomysł. Co jeszcze musiałoby się wytworzyć, aby funkcja aparatu Golgiego była użyteczna?

Pytanie 14-21. Jeżeli do zintegrowania białek błonowych z błoną ER potrzebny jest kanał translokacyjny ER (który sam jest zbudowany z białek), to w jaki sposób pierwsze białko kanału translokacyjnego zostało wbudowane w błonę ER?

Pytanie 14-22. Szkic na rys. P14-22 przedstawia schematycznie mikrografię elektronową pokazaną na trzeciej pozycji rys. 14-18A. Podaj nazwy struktur oznakowanych na tym szkicu literami.



Rys. P14-22

15

Sygnalizacja międzykomórkowa

OGÓLNE ZASADY SYGNALIZACJI KOMÓRKOWEJ

- **Sygnały mogą działać na krótki lub długi dystans**
- **Każda komórka odpowiada na ograniczony zestaw sygnałów**
- **Receptory przekazują sygnały po wewnątrzkomórkowych szlakach sygnalizacyjnych**
- **Niektóre cząsteczki sygnałowe mogą przejść przez błonę komórkową**
- **Tlenek azotu może wnikać do komórek i aktywować w nich enzymy bezpośrednio**
- **Istnieją trzy główne klasy receptorów powierzchni komórki**
- **Receptory jonotropowe zamieniają sygnały chemiczne w elektryczne**
- **Wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacyjne działają jak seria przełączników molekularnych**

RECEPTORY METABOTROPOWE (WSPÓŁPRACUJĄCE Z BIAŁKAMI G)

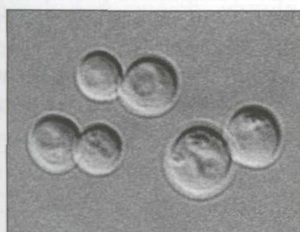
- **Stymulacja receptorów metabotropowych aktywuje podjednostki białek G**
- **Pewne białka G regulują kanały jonowe**
- **Pewne białka G aktywują enzymy błonowe**
- **Szlak cyklicznego AMP może aktywować enzymy i włączać działanie genów**
- **Szlak informacyjny wiodący przez fosfolipazę C prowadzi do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+}**
- **Sygnał Ca^{2+} uruchamia wiele procesów biologicznych**
- **Wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacyjne mogą osiągnąć zadziwiającą szybkość, wrażliwość i zdolność adaptacji: fotoreceptory w oku**

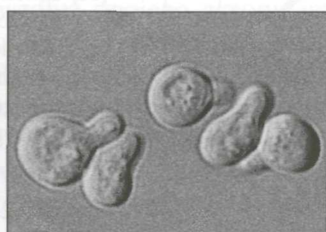
RECEPTORY O AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ (RECEPTORY KATALITYCZNE)

- **Zaktywowane receptorowe kinazy tyrozynowe tworzą kompleks z wewnątrzkomórkowymi białkami sygnalizacyjnymi**
- **Receptorowe kinazy tyrozynowe aktywują białko Ras, wiążące GTP**
- **Sieć kinaz białkowych integruje informację, co umożliwia kompleksową** ***kontrolę zachowania się komórek***

Poszczególne komórki, podobnie jak organizmy wielokomórkowe, muszą odbierać sygnały z otoczenia i na nie odpowiadać. Na przykład, typowa wolno żyjąca komórka musi być zdolna do wyczucia pożywienia, rozróżniania światła od ciemności, a także wykrywania obecności trucizn i prześladowców oraz ich unikania. Jeśli taka komórka ma prowadzić życie społeczne, musi umieć wykorzystać swoją wrażliwość do komunikowania się z innymi komórkami. Gdy na przykład komórka drożdży jest gotowa do koniugacji, wydziela małe białko o nazwie czynnik koniugacji, na który inne komórki drożdży są wrażliwe: wykrywają one czynnik koniugacji i odpowiadają na niego powstrzymując przebieg swego cyklu komórkowego i wysuwając wypustkę w kierunku komórki emitującej sygnał (rys. 15-1).

W organizmie wielokomórkowym komórki muszą koordynować swoje zachowanie na wiele różnych sposobów. Tak jak w zaaferowanej wieloma sprawami społeczności, w organizmie trwa stały zgiełk informacyjny: sąsiedzi rozmawiają o sprawach prywatnych, publiczne informacje są nadawane do całej populacji, informacje pilne są przekazywane z daleka do poszczególnych osobników, a także bije się na alarm, gdy zagraża niebezpieczeństwo. Te wzajemne oddziaływania socjalne są istotne zarówno dla wykreowania społeczności, jak i dla jej dalszego istnienia. Na wczesnym etapie rozwoju komórki zarodka wymieniają sygnały determinujące, jaką rolę ma pełnić każda komórka i jaką zajmie pozycję, oraz decydujące o życiu, śmierci lub podziale. W późniejszych etapach rozwoju ogromna różnorodność sygnałów koordynuje wzrost zwierzęcia, jego fizjologię i zachowanie się na co dzień. Również w roślinach komórki pozostają ze sobą w stałym kontakcie informacyjnym, zarówno odpowiadając na warun-


(A)


(B)


(C)

Rys. 15-1. Komórki drożdży reagują na czynnik koniugacji. Komórki *Saccharomyces cerevisiae* normalnie są kuliste (A), jednak pod działaniem czynnika koniugacji, wytworzonego przez sąsiadujące komórki drożdży, formują wypustki skierowane do źródła tego czynnika (B). Komórki przyjmujące ten kształt w odpowiedzi na sygnał koniugacji nazwano „shmoos", postać z kreskówek Al Cappa z lat 40 (C). (A i B — dzięki uprzejmości: Michael Snyder; C — copyright Capp Enterprises, Inc., all rights reserved)

ki światła, ciemności i temperatury, które kierują cyklem wzrostu, kwitnienia i owocowania, jak i dostosowując wydarzenia, które zaszły w jednej części rośliny do zaistniałych w innym jej miejscu.

W tym rozdziale omówimy pewne najważniejsze sposoby, którymi komórki zwierząt komunikują się ze sobą, oraz sposoby, jakimi komórki interpretują odebrane sygnały. Pozostaniemy głównie przy komórkach zwierzęcych, ponieważ mechanizmy odbioru sygnałów i ich interpretacji przez komórki roślinne są o wiele mniej znane. Rozpoczniemy od przeglądu głównych zasad sygnalizacji komórkowej, a następnie zajmiemy się dwoma z kilku głównych systemów używanych przez komórki zwierzęce do odbioru i interpretacji sygnałów.

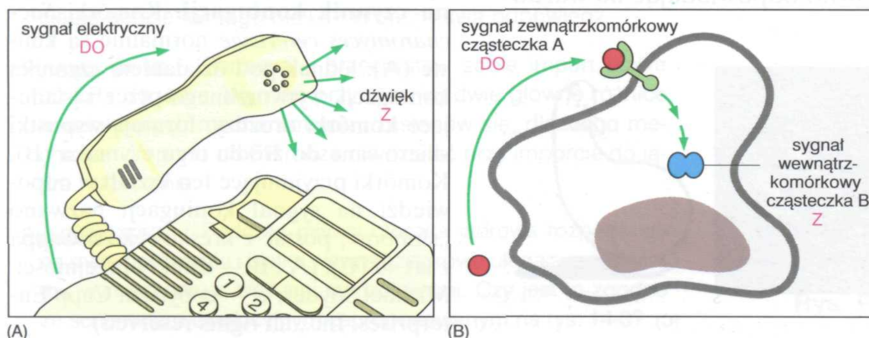
Ogólne zasady sygnalizacji komórkowej

Aby przekazać wiadomość od jednej osoby do drugiej, informacja może być najpierw napisana na papierze, potem odczytana głośno, następnie niesiona po drutach telefonicznych jako impulsy elektryczne, a w końcu wyrażona w postaci impulsów nerwowych w mózgu odbiorcy. Na kolejnych etapach tego szlaku informacyjnego tę samą informację reprezentują różne formy sygnałów; krytycznymi punktami w przekazywaniu informacji są te, w których zmienia ona formę. Proces takiej przemiany nosi nazwę **przekształcania sygnałów** (rys. 15-2).

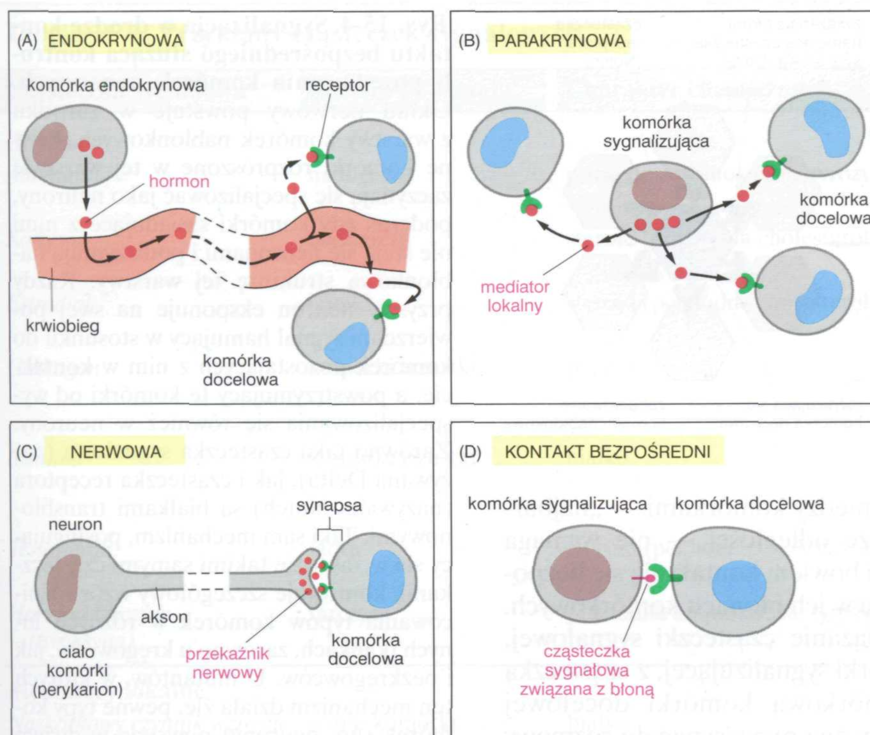
Sygnały przekazywane między komórkami są o wiele prostsze niż informacje przekazywane między ludźmi: w typowych przypadkach szczególny typ cząsteczki — *cząsteczka sygnałowa* — jest wytwarzany przez jedną komórkę — *komórkę sygnalizującą*, a wykrywany przez drugą — *komórkę docelową* — za pomocą *białkowego receptora*, który rozpoznaje cząsteczkę sygnałową i na nią reaguje. Receptor będący białkiem przeprowadza pierwszy etap serii procesów przekształcenia sygnału w szlaku sygnalizacyjnym; dzieje się to w komórce docelowej, w której dochodzące sygnały zewnątrzkomórkowe przemieniane są w sygnały wewnątrzkomórkowe, decydujące o zachowaniu się komórki. Większość tego rozdziału jest poświęcona odbieraniu sygnału i jego przekształcaniu. Gdy biologowie komórki mówią o **sygnalizacji komórkowej**, mają na myśli głównie te dwa aspekty. Jednak najpierw przyjrzymy się po krótce różnym typom sygnałów, które komórki wysyłają między sobą.

Sygnały mogą działać na krótki lub długi dystans

W organizmie wielokomórkowym komórki używają do przesyłania sygnałów innym komórkom setek różnych rodzajów cząsteczek zewnątrzko-



Rys. 15-2. Przekształcanie sygnału. (A) Słuchawka telefoniczna przekształca sygnał elektryczny w sygnał dźwiękowy. (B) Komórka przekształca sygnał zewnątrzkomórkowy (cząsteczka sygnałowa A) w sygnał wewnątrzkomórkowy (cząsteczka sygnałowa B)



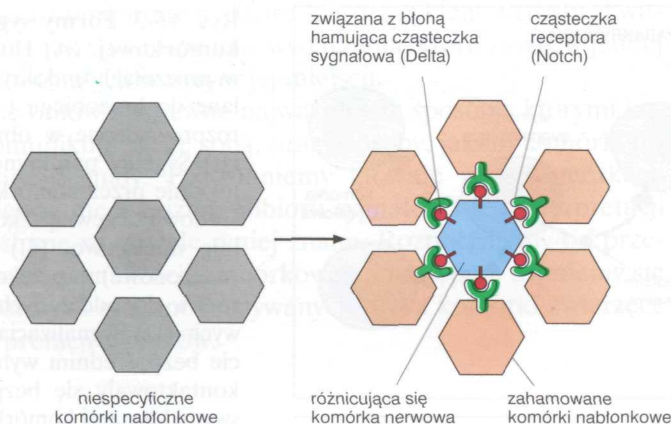
Rys. 15-3. Formy sygnalizacji międzykomórkowej. (A) Hormony wytwarzane w gruczołach endokrynowych są wydzielane do krwiobiegu i mogą być szeroko rozprowadzone w obrębie całego ciała. (B) Sygnały parakrynowe są wydzielane lokalnie przez komórki do sąsiadującego środowiska zewnątrzkomórkowego i działają miejscowo. (C) Sygnały nerwowe (neuronowe) są przekazywane wzdłuż aksonów do oddalonych komórek docelowych. (D) Sygnalizacja oparta na kontakcie bezpośrednim wymaga, aby komórki kontaktowały się bezpośrednio ze sobą swymi błonami komórkowymi. W sygnalizacji endokrynowej, parakrynowej i nerwowej są używane cząsteczki sygnałowe, z których wiele należy do tych samych typów; istotne różnice sprowadzają się do szybkości i selektywności, z jaką sygnały są dostarczane do odpowiednich komórek docelowych

mórkowych, takich jak białka, peptydy, aminokwasy, nukleotydy, steroidy, pochodne kwasów tłuszczowych, a nawet rozpuszczone gazy, ale podstawowych typów komunikowania się jest tylko kilka (rys. 15-3).

Systemem najbardziej powszechnym jest rozesłanie sygnału po całym ciele przez wydzielenie go do krwiobiegu (u zwierząt) lub soku (u roślin). Użyte w tym systemie cząsteczki sygnałowe nazywamy **hormonami**, a u zwierząt komórki wytwarzające hormony nazywamy komórkami *endokrynowymi* (rys. 15-3A).

Bardziej „intymnym" typem komunikowania się jest sygnalizacja *parakrynowa*. W systemie tym cząsteczki sygnałowe dyfundują miejscowo w środowisku międzykomórkowym, nie oddalając się zbytnio od komórki, która je wydzieliła: działają one jako **mediatory lokalne** (rys.15-3B). W ten właśnie sposób działa wiele cząsteczek sygnałowych, które regulują stany zapalne w miejscach infekcji lub proliferację komórek w procesie gojenia się ran.

Trzecim typem komunikowania się komórek jest sygnalizacja **nerwowa (neuronowa)**. Podobnie jak w sygnalizacji hormonalnej (endokrynowej), informacja jest przesyłana często na duże odległości; jednakże w sygnalizacji nerwowej informacja jest przesyłana bardzo szybko odrębnymi liniami do indywidualnych komórek (rys. 15-3C). Jak wspomniano w rozdz. 12, akson neuronu kończy się specjalnymi połączeniami (synapsami) na komórkach docelowych, zdala od perykarionu tego neuronu. Gdy neuron zostaje pobudzony przez sygnały z otoczenia lub innych komórek nerwowych, wysyła wzdłuż swojego aksonu impulsy elektryczne z szybkością sięgającą 100 metrów na sekundę. Po dotarciu do zakończenia aksonu wewnątrzkomórkowe sygnały elektryczne zostają przekształcone w zewnątrzkomórkowe sygnały chemiczne: każdy impuls elektryczny stymuluje w zakończeniu nerwowym wydzielenie porcji cząsteczek o nazwie **przekaźniki nerwowe** (neuroprzekaźniki, neurotransmittery). Cząsteczki te dyfundują przez wąską (< 100 nm) szczelinę między błoną zakończenia aksonu (błoną presynaptyczną) a błoną komórki docelowej (błoną postsynaptyczną) w czasie krótszym niż milisekundy.



Rys. 15-4. Sygnalizacja w drodze kontaktu bezpośredniego służąca kontroli powstawania komórek nerwowych. Układ nerwowy powstaje w zarodku z warstwy komórek nabłonkowych. Pewne komórki rozproszone w tej warstwie zaczynają się specjalizować jako neurony, podczas gdy komórki sąsiadujące z nimi nie stają się neuronami i podtrzymują nabłonkową strukturę tej warstwy. Każdy przyszły neuron eksponuje na swej powierzchni sygnał hamujący w stosunku do komórek pozostających z nim w kontakcie, a powstrzymujący te komórki od wyspecjalizowania się również w neurony. Zarówno taka cząsteczka sygnałowa (nazywana Delta), jak i cząsteczka receptora (nazywana Notch) są białkami transbłonowymi. Taki sam mechanizm, posługujący się w zasadzie takimi samymi cząsteczkami, kontroluje szczegółowy wzór różnicowania typów komórek w różnych innych tkankach, zarówno u kręgowców, jak i bezkręgowców. U mutantów, w których ten mechanizm działa źle, pewne typy komórek (np. neurony) powstają w dużym nadmiarze kosztem innych komórek

Czwarty typ przekazywania informacji między komórkami — „najbardziej intymny" i działający na najmniejsze odległości — nie wymaga wydzielania cząsteczek z komórki, komórki bowiem kontaktują się bezpośrednio przez cząsteczki sygnałowe zawarte w ich błonach komórkowych. Informacja zostaje przekazana przez związanie cząsteczki sygnałowej, zakotwiczonej w błonie komórkowej komórki sygnalizującej, z cząsteczką receptora wbudowanego w błonę komórkową komórki docelowej (rys. 15-3D). O ile sygnalizację nerwową można przyrównać do rozmowy telefonicznej, o tyle taka *sygnalizacja przez kontakt bezpośredni* byłaby prywatną rozmową w cztery oczy.

Sygnalizacja przez kontakt bezpośredni ma na przykład wielkie znaczenie w rozwoju embrionalnym, gdy komórki sąsiadujące ze sobą w tkankach, początkowo podobne do siebie, mają wyspecjalizować się w różny sposób. Tak więc w warstwie komórek, która daje początek systemowi nerwowemu, tylko niektóre rozproszone komórki zostaną wybrane do różnicowania się w neurony, natomiast sąsiadujące z nimi komórki pozostaną nieneuronowe. Sygnał kontrolujący ten proces jest przekazywany przez bezpośredni kontakt komórek ze sobą: każdy przyszły neuron hamuje w sąsiadujących z nim bezpośrednio komórkach ewentualny proces różnicowania się ich w neurony (rys. 15-4).

W tabeli 15-1 przedstawiono niektóre przykłady hormonów, mediatorów lokalnych, przekaźników nerwowych i cząsteczek sygnałowych kontaktu bezpośredniego. Działanie niektórych z tych cząsteczek będzie omówione bardziej szczegółowo w dalszym ciągu tego rozdziału.

Pytanie 15-1. Aby cząsteczki sygnałowe działające w systemie parakrynowym powodowały wyłącznie lokalną odpowiedź, trzeba zapobiec ich rozchodzeniu się zbyt daleko od miejsca, w którym powstają. Zaproponuj różne sposoby, jakimi można to osiągnąć. Objaśnij swoje odpowiedzi.

Każda komórka odpowiada na ograniczony zestaw sygnałów

Typowa komórka wielokomórkowego organizmu jest eksponowana na setki różnych cząsteczek sygnałowych w jej otoczeniu. Mogą one być związane z powierzchniami sąsiednich komórek lub z substancją międzykomórkową, ale przeważnie występują swobodnie w płynie międzykomórkowym. Stosownie do swej zaprogramowanej funkcji komórka musi odpowiadać na mieszaninę sygnałów selektywnie, reagując na pewne z nich, a nie zwracając uwagi na inne.

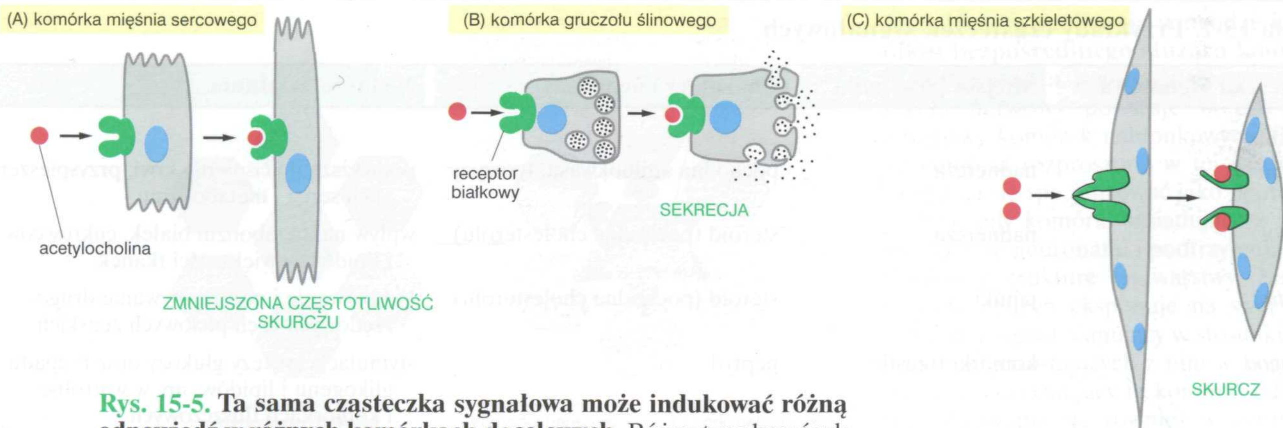
Czy komórka zareaguje na cząsteczkę nerwową, zależy w pierwszym rzędzie od tego, czy ma receptor dla tego sygnału. Bez receptora komórka będzie głucha na sygnał i nie będzie mogła na niego odpowiedzieć. Dlatego też, wytwarzając tylko ograniczony zestaw receptorów z tysięcy możliwych, komórka zawęża zakres sygnałów, które mogą na nią wpły-

Tabela 15-1. Przykłady cząsteczek sygnałowych

Cząsteczka sygnałowa	Miejsce powstania	Charakter chemiczny	Niektóre działania
Hormony			
Adrenalina	nadnercza	pochodna aminokwasu, tyrozyny	podwyższenie ciśnienia krwi, przyspieszenie akcji serca i metabolizmu
Kortyzol	nadnercza	steroid (pochodna cholesterolu)	wpływ na metabolizm białek, cukrowców i lipidów w większości tkanek
Estradiol	jajniki	steroid (pochodna cholesterolu)	indukowanie i podtrzymywanie drugorzędowych cech płciowych żeńskich
Glukagon	komórki trzustki	peptyd	stymulacja syntezy glukozy oraz rozpadu glikogenu i lipidów, np. w wątrobie i komórkach tłuszczowych
Insulina	komórki trzustki	białko	stymulacja pobierania glukozy oraz syntezy białek i lipidów, np. w komórkach wątroby
Testosteron	jądra	steroid (pochodna cholesterolu)	indukowanie i podtrzymywanie drugorzędowych cech płciowych męskich
Hormon tarczycy (tyroksyna)	tarczyca	pochodna aminokwasu, tyrozyny	stymulacja metabolizmu wielu typów komórek
Mediatory lokalne			
Naskórkowy czynnik wzrostu (EGF)	różne komórki	białko	stymulacja proliferacji komórek epidermy i innych typów komórek
Czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (PDGF)	różne komórki, w tym płytki krwi	białko	stymulacja proliferacji wielu typów komórek
Czynnik wzrostu nerwów (NGF)	różne komórki tkanki	białko	ułatwianie (promowanie) przeżycia pewnych klas neuronów; ułatwianie wzrostu ich aksonów
Histamina	komórki tuczne	pochodna aminokwasu, histydyny	rozszerzanie naczyń krwionośnych i zwiększanie ich przepuszczalności, wspomagające powstawanie odczynu zapalnego
Tlenek azotu (NO)	komórki nerwowe; komórki śródbłonka wyścielające naczynia krwionośne	rozpuszczony gaz	rozkurczanie komórek mięśni gładkich; regulacja aktywności komórek nerwowych
Przekaźniki nerwowe			
Acetylocholina	zakończenia nerwu	pochodna choliny	funkcja pobudzającego przekaźnika nerwowego w wielu synapsach typu neuron–mięsień i neuron–neuron (np. w ośrodkowym układzie nerwowym)
Kwas γ-aminomasłowy (GABA)	zakończenia nerwu	pochodna aminokwasu, kwasu glutaminowego	funkcja hamującego przekaźnika nerwowego w ośrodkowym układzie nerwowym
Cząsteczki sygnałowe działające w kontakcie bezpośrednim			
Delta	przyszłe neurony; różne inne typy komórek embrionalnych	białko transbłonowe	hamowanie specjalizacji sąsiednich komórek w tym samym kierunku, w jakim specjalizuje się komórka wysyłająca ten sygnał

wać. Nawet jednak tak ograniczony zakres sygnałów może być nadal użyty do kontrolowania — w bardzo złożony sposób — zachowania się komórki. Złożoność taka jest dwojakiego rodzaju.

Po pierwsze, jeden sygnał wiążący się z jednym typem receptora może wywołać w komórce docelowej wiele efektów: równocześnie mogą ulec zmianie kształt, ruch, metabolizm i ekspresja genów. Jak zobaczymy, sygnał

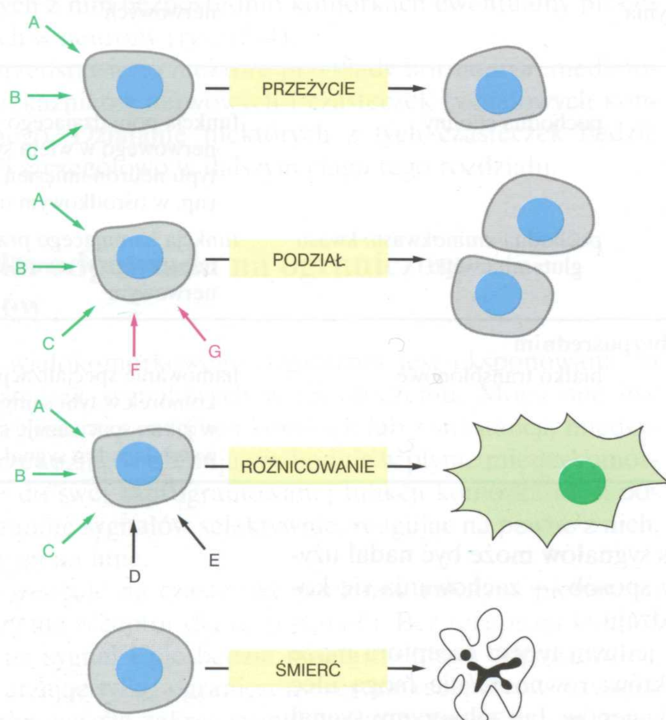


Rys. 15-5. Ta sama cząsteczka sygnałowa może indukować różną odpowiedź w różnych komórkach docelowych. Różne typy komórek są w różny sposób wyspecjalizowane w zakresie odpowiedzi na przekaźnik nerwowy — acetylocholinę. W (A) i (B) cząsteczka sygnałowa wiąże się z podobnymi białkami receptorowymi, ale te ostatnie aktywują różne mechanizmy odpowiedzi w komórkach wyspecjalizowanych w różnych funkcjach. W (C) komórka wytwarza odmienny typ receptora dla tego samego sygnału. Jak później zobaczymy, różne typy receptorów generują zupełnie odmienne sygnały wewnątrzkomórkowe i przez to umożliwiają odmienny sposób reagowania różnych typów komórek mięśniowych na acetylocholinę. (D) Budowa chemiczna acetylocholiny

(D) acetylocholina

$$H_3C-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-\overset{\overset{\displaystyle CH_3}{|}}{\underset{\underset{\displaystyle CH_3}{|}}{N^+}}-CH_3$$

jest przeważnie przenoszony z receptora powierzchni komórki do jej wnętrza przez zestaw innych składników wewnątrzkomórkowych, co powoduje efekty o dużym zasięgu. Ten wewnątrzkomórkowy system przekazywania i wewnątrzkomórkowe obiekty docelowe, na które on działa, różnią się w komórkach o poszczególnym typie sygnalizacji, przez co różne komórki odpowiadają na ten sam sygnał w odmienny sposób. Jeśli więc komórka mięśnia sercowego eksponowana jest na przekaźnik nerwowy — acetylocholinę — zmniejsza częstotliwość swych skurczów, ale ten sam sygnał w komórkach gruczołu ślinowego powoduje wydzielanie śliny (rys. 15-5).



Rys. 15-6. Komórka zwierzęca jest uzależniona od różnorodnych sygnałów zewnątrzkomórkowych. Każdy typ komórek ma zestaw białek receptorowych umożliwiający im reagowanie z odpowiednim zestawem cząsteczek sygnałowych wytwarzanych przez inne komórki. Te cząsteczki sygnałowe działają w kombinacjach umożliwiających regulowanie zachowania się komórki. Jak pokazano tu, wiele komórek wymaga różnorodnych sygnałów (*zielone strzałki*) do przeżycia, dodatkowych sygnałów (*czerwone strzałki*) do dzielenia się i jeszcze innych sygnałów (*czarne strzałki*) do różnicowania. Większość komórek pozbawionych odpowiednich sygnałów ulega swego rodzaju samobójstwu, znanemu jako zaprogramowana śmierć komórki, czyli apoptoza. (Proces ten omówiono w rozdz. 18)

Drugi rodzaj złożoności wynika z tego, że typowa komórka dysponuje całym zbiorem różnych receptorów — wprawdzie nie tysiącem, ale raczej kilku tuzinami, co wystarcza, aby komórka była wrażliwa równocześnie na wiele sygnałów zewnątrzkomórkowych. Sygnały te, działając łącznie, mogą wywołać odpowiedzi będące czymś więcej niż sumą efektów każdego sygnału z osobna. Wewnątrzkomórkowy system przekazywania informacji z różnych sygnałów zazębia się tak, że obecność jednego sygnału modyfikuje odpowiedź na inny sygnał. Tak więc jedna kombinacja sygnałów może po prostu podtrzymywać życie komórki; inna może wymuszać jej różnicowanie w specjalnym kierunku; jeszcze inna może powodować podział komórki; wreszcie, gdy nie występują żadne sygnały, komórka może być zaprogramowana do śmierci (rys. 15-6). Tym sposobem stosunkowo mała liczba sygnałów, użyta w różnych kombinacjach, może zapewnić subtelną i kompleksową kontrolę nad zachowaniem się komórki.

Receptory przekazują sygnały po wewnątrzkomórkowych szlakach sygnalizacyjnych

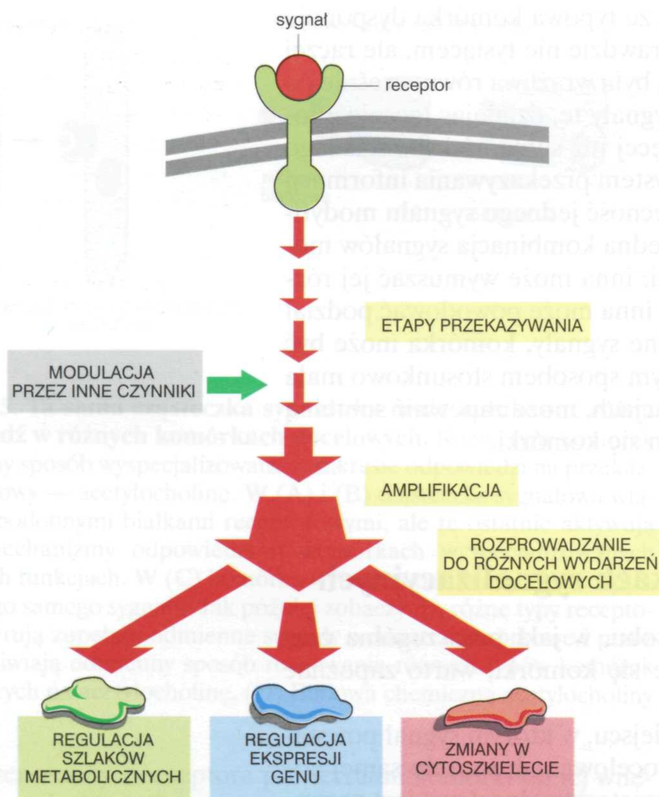
Przed zagłębieniem się w szczegóły sposobu, w jaki poszczególna cząsteczka sygnałowa kontroluje zachowanie się komórki, warto zapoznać się z kilkoma ogólnymi zasadami.

Odebranie sygnału rozpoczyna się w miejscu, w którym sygnał powstający poza komórką napotyka cząsteczkę docelową należącą do samej komórki. Zasadniczo w każdym przypadku cząsteczką docelową jest **receptor,** białko zazwyczaj aktywowane przez tylko jeden typ sygnału. Receptor przeprowadza początkowy etap przenoszenia sygnału, jakim jest jego przekształcenie: odbiera sygnał zewnętrzny i jako odpowiedź wytwarza nowy sygnał wewnątrzkomórkowy (patrz rys. 15-2B). Z zasady etap ten jest tylko pierwszym wydarzeniem w następującym dalej łańcuchu wewnątrzkomórkowych procesów przenoszenia sygnałów. W procesach tych informacja jest przekazywana z jednego zestawu *wewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnalizacyjnych* do drugiego i tak kolejno, aż do wystąpienia ostatecznej *odpowiedzi* komórki, którą może być aktywacja enzymu metabolicznego, rozpoczęcie ekspresji genu lub zmuszenie cytoszkieletu do działania.

Takie swego rodzaju sztafety wewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych, czyli **kaskady sygnalizacyjne**, pełnią kilka decydujących funkcji (rys. 15-7):

1. *Przenoszą* one fizycznie sygnał z punktu, gdzie odebrała go komórka, do mechanizmu komórkowego, który dokona odpowiedzi, a który jest często umieszczony w innej części komórki.
2. *Przekształcają* one sygnał w formę molekularną, która jest zdolna do wywołania odpowiedzi.
3. W większości przypadków kaskady sygnalizacyjne również *amplifikują* odebrany sygnał, wzmacniając go tak, że kilka zewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych wystarcza do wywołania silnej odpowiedzi.
4. Kaskady sygnalizacyjne mogą *rozprowadzić* sygnał tak, że będzie on wpływał równolegle na kilka procesów: na każdym etapie szlaku sygnał może zostać *rozdzielony* i przeniesiony do kilku różnych „celów" wewnątrzkomórkowych, tworząc rozgałęzienia w diagramie przepływu informacji i wywołując kompleksową odpowiedź (patrz rys. 15-7).
5. W końcu, każdy etap kaskady sygnalizacyjnej jest otwarty na działanie innych czynników tak, iż przewodzenie sygnału może być *modulowane* w zależności od warunków panujących wewnątrz i na zewnątrz komórki.

Pytanie 15-2. Gdy pojedynczy foton światła zostaje zaabsorbowany przez fotoreceptor rodopsynę, aktywuje ok. 200 poszczególnych cząsteczek transducyny, wewnątrzkomórkowego białka sygnalizacyjnego. Z kolei każda cząsteczka transducyny wiąże się z enzymem fosfodiesterazą i aktywuje ją tak, że enzym ten hydrolizuje 4000 cząsteczek cyklicznego GMP na sekundę. Cykliczny GMP jest małą cząsteczką, podobną do cyklicznego AMP, która w pręcikowych komórkach fotoreceptorowych wiąże się od strony cytozolu z kanałami Na^+ w błonie komórkowej i podtrzymuje otwartą konformację tych kanałów, o czym będzie mowa dalej (patrz rys. 15-26). Jaki jest stopień amplifikacji sygnału, jeżeli każda cząsteczka transducyny pozostaje aktywna przez 100 milisekund?

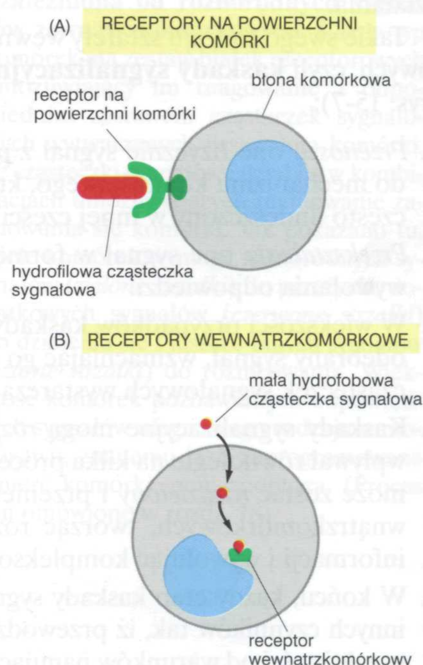


Rys. 15-7. Wewnątrzkomórkowa kaskada sygnalizacyjna. Receptor białkowy eksponowany na powierzchni komórki przekształca sygnał zewnątrzkomórkowy w wewnątrzkomórkowy, inicjując kaskadę sygnalizacyjną, która wiąże sygnał z wnętrzem komórki, amplifikuje go i rozprowadza. Wiele etapów tej kaskady może ulegać modulacji ze strony innych procesów w komórce.

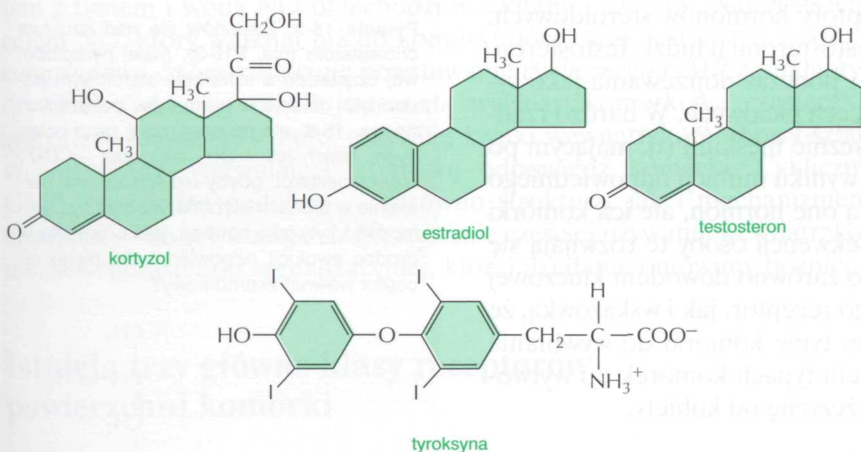
Rozważymy najpierw niektóre prostsze i bardziej bezpośrednie szlaki sygnalizacyjne, a dopiero potem zajmiemy się kaskadami dłuższymi, które przekazują sygnały z receptorów zawartych w błonie komórkowej komórek zwierzęcych.

Niektóre cząsteczki sygnałowe mogą przejść przez błonę komórkową

Zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe można ogólnie podzielić na dwie klasy, odpowiadające dwóm zasadniczo różnym rodzajom receptorów. Pierwsza i największa klasa sygnałów obejmuje cząsteczki, które są za duże i zbyt hydrofilowe, aby przejść przez błonę komórkową komórki docelowej. Dlatego też białka pełniące funkcje receptorów dla tych cząsteczek sygnałowych muszą być wbudowane w błonę komórkową komórki docelowej i przenosić informację przez błonę (rys. 15-8A). Druga, mniejsza klasa sygnałów obejmuje cząsteczki, które są dostatecznie małe i hydrofobowe, aby móc dyfundować przez błonę komórkową. Receptory dla tych cząsteczek sygnałowych leżą we wnętrzu komórki docelowej i z zasa-



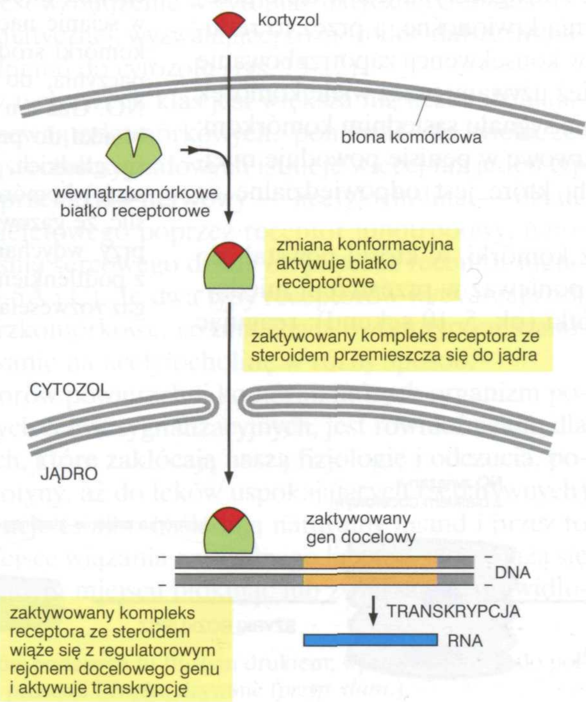
Rys. 15-8. Zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe wiążą się albo z receptorami powierzchni komórki, albo z receptorami wewnątrzkomórkowymi. (A) Większość cząsteczek sygnałowych jest hydrofilowa i dlatego nie mogą one przekroczyć wprost błony komórkowej; zamiast tego wiążą się na powierzchni komórki z receptorami, które z kolei generują wewnątrz komórki docelowej jeden lub więcej sygnałów. (B) Natomiast pewne małe hydrofobowe cząsteczki sygnałowe dyfundują przez błonę komórkową i wiążą się z receptorami wewnątrz komórki docelowej — albo w cytozolu (co pokazano), albo w jądrze



Rys. 15-9. Niektóre małe hydrofobowe hormony, których receptorami są wewnątrzkomórkowe regulatorowe białka genów. Miejsca powstawania i funkcje tych hormonów podano w tab. 15-1 (s. 487). Receptory dla wszystkich tych hormonów są ewolucyjnie spokrewnione i należą do *nadrodziny receptorów hormonów steroidowych*, kontrolujących regulatorowe białka genów

dy są albo regulatorowymi białkami genów (omówionymi w rozdz. 8), albo enzymami. Również te receptory są aktywowane przez związanie z cząsteczką sygnałową (rys. 15-8B).

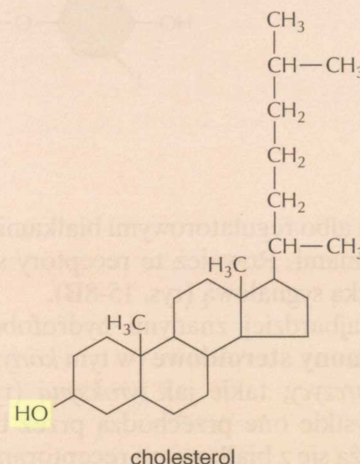
Najbardziej znanymi hydrofobowymi cząsteczkami sygnałowymi są **hormony steroidowe** (w tym *kortyzol, estradiol* i *testosteron*) oraz *hormony tarczycy,* takie jak *tyroksyna* (rys. 15-9; patrz też tab. 15-1, s. 487). Wszystkie one przechodzą przez błonę komórkową komórki docelowej i wiążą się z białkowymi receptorami znajdującymi się albo w cytozolu, albo w jądrze. Receptorami tych hormonów są regulatorowe białka genów, które w nie wystymulowanej komórce występują w formie nieaktywnej. Po związaniu swego hormonu receptor ulega dużej zmianie konformacyjnej, co umożliwia mu wiązanie się z odpowiednią regulatorową sekwencją w DNA; dopiero wtedy może on inicjować lub hamować transkrypcję wybranego zespołu genów (rys. 15-10). Dla każdego typu hormonu istnieje odrębny receptor; każdy receptor działa w odrębnych zespołach miejsc regulatorowych i dlatego reguluje odrębne zespoły genów.



Rys. 15-10. Steroidowy hormon kortyzol działa przez aktywację regulatorowych białek genów. Kortyzol dyfunduje wprost przez błonę komórkową i wiąże się ze swym białkowym receptorem w cytozolu. Następnie kompleks receptora ze steroidem transportowany jest do jądra poprzez pory jądrowe. Związanie steroidu aktywuje białko receptora nadając mu zdolność wiązania się ze specyficzną sekwencją regulatorową w DNA i aktywowania transkrypcji genu, co omówiono w rozdz. 8. Receptory kortyzolu i pewnych innych hormonów steroidowych mieszczą się w cytozolu, podczas gdy receptory innych cząsteczek sygnałowych, należących do tej rodziny, mieszczą się wprost w jądrze

Ilustracją istotnej roli, jaką pełnią receptory hormonów steroidowych, są groźne konsekwencje braku receptora testosteronu u ludzi. Testosteron, męski hormon płciowy, działa w zarodku i podczas dojrzewania jako sygnał do rozwoju drugorzędowych męskich cech płciowych. W bardzo rzadkich przypadkach osobom będącym genetycznie męskimi (tj. mającym po jednym chromosomie X i Y) brakuje — w wyniku mutacji odpowiedniego genu — receptora testosteronu: wytwarzają one hormon, ale ich komórki nie mogą na niego odpowiedzieć. W konsekwencji osoby te rozwijają się z zewnętrznym wyglądem kobiecym. Jest to zarówno dowodem kluczowej roli, jaką w działaniu testosteronu pełni jego receptor, jak i wskazówką, że receptor jest potrzebny nie tylko w jednym typie komórki do wywołania jednego tylko efektu, ale przeciwnie, w wielu typach komórek do wytworzenia całej gamy cech rozróżniających mężczyznę od kobiety.

Pytanie 15-3. Zastanów się nad strukturą cholesterolu (rys. P15-3), małej hydrofobowej cząsteczki o szkielecie sterolowym podobnym do trzech hormonów pokazanych na rys. 15-9, ale mającej mniej grup polarnych, takich jak —OH, =O oraz —COO⁻. Czy cholesterol, gdyby nie występował normalnie w błonach komórki, mógłby być skutecznie użyty jako hormon, jeśli powstałby w drodze ewolucji odpowiedni dla niego receptor wewnątrzkomórkowy?



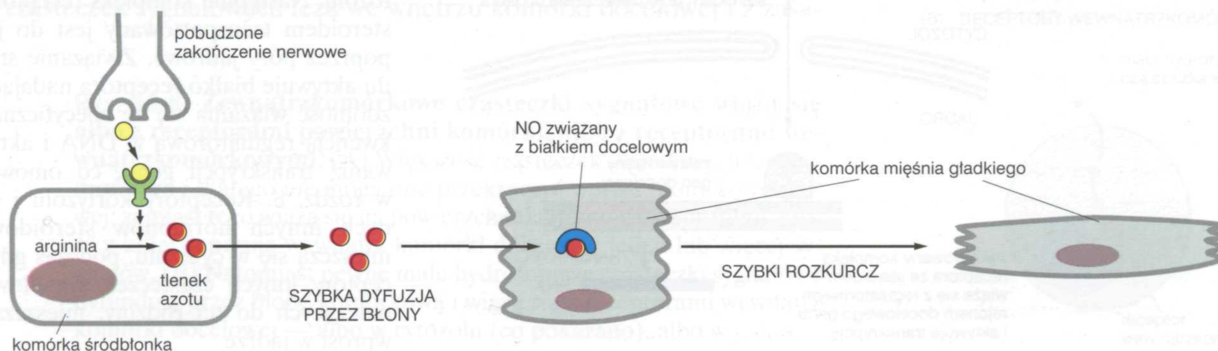
Rys. P15-3

Tlenek azotu może wnikać do komórek i aktywować w nich enzymy bezpośrednio

Odpowiedzi komórek, polegające na zmianach ekspresji genów, mogą następować z opóźnieniem wielu minut, a nawet godzin, ponieważ geny muszą najpierw ulec transkrypcji, a powstały informacyjny RNA — translacji do białka. Tam gdzie komórka musi odpowiedzieć na sygnał w ciągu kilku sekund lub minut, o wiele szybszym sposobem wywołania efektu jest bezpośrednia aktywacja enzymu. Godnym uwagi przykładem cząsteczki sygnałowej, która przechodzi przez błonę komórkową i aktywuje enzym wewnątrzkomórkowy, jest **tlenek azotu (NO)**. Ten rozpuszczony gaz powstaje z aminokwasu argininy i działa jako lokalny mediator w wielu tkankach. Komórki śródbłonka — spłaszczone komórki wyścielające każde naczynie krwionośne — w odpowiedzi na pobudzenie przez zakończenia nerwowe uwalniają NO, który powoduje rozkurcz (relaksację) komórek mięśni gładkich w ścianie naczynia, przez co naczynie rozszerza się i krew płynie przez nie łatwiej (rys. 15-11). Wpływ, jaki wywiera NO na naczynie krwionośne, dostarcza wyjaśnienia działania nitrogliceryny, którą od ponad 100 lat leczy się pacjentów cierpiących na nerwicę serca (ból wywołany niedostatecznym przepływem krwi przez mięsień sercowy). Nitrogliceryna jest w ciele przekształcana do NO, który rozkurcza naczynia krwionośne, a przez to redukuje obciążenie serca pracą, zmniejszając w konsekwencji zapotrzebowanie mięśnia sercowego na tlen. NO jest również używany przez wiele komórek nerwowych do bezpośredniego przekazania sygnału sąsiednim komórkom: np. NO wydzielony przez zakończenia nerwowe w penisie powoduje miejscowe rozszerzenie naczyń krwionośnych, które jest odpowiedzialne za erekcję.

Rozpuszczony NO łatwo dyfunduje z komórki, w której powstał, do komórek sąsiednich. Działa miejscowo, ponieważ w przestrzeni międzykomórkowej jego półokres życia jest krótki (ok. 5–10 sekund); reagując

Rys. 15-11. Rola tlenku azotu (NO) w rozkurczu mięśnia gładkiego w ścianie naczynia krwionośnego. Acetylocholina uwolniona z zakończeń nerwów w ścianie naczyń krwionośnych aktywuje komórki śródbłonka, które wyścielają te naczynia, do wytwarzania i wydzielania NO. Gaz ten dyfunduje z komórek śródbłonka do przylegających komórek mięśni gładkich, powodując rozkurcz (relaksację) komórek mięśnia. Należy podkreślić, że gazowy NO jest wysoce toksyczny przy wdychaniu i nie należy go mylić z podtlenkiem azotu (N_2O) znanym jako gaz rozweselający



tam z tlenem i wodą NO przechodzi w azotany i azotyny. Najczęstszym celem NO, który wniknął już do komórki docelowej, jest enzym *cyklaza guanylanowa*, która katalizuje powstawanie *cyklicznego GMP* z nukleotydu GTP. Cykliczny GMP jest małą wewnątrzkomórkową cząsteczką sygnalizacyjną, która z kolei aktywuje krótki wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny, wyzwalający końcową odpowiedź komórki. Cykliczny GMP jest bardzo podobny — zarówno strukturą, jak i mechanizmem działania — do *cyklicznego AMP*, znacznie częściej używanej wewnątrzkomórkowej cząsteczki sygnalizacyjnej, której działanie omówimy później.

Istnieją trzy główne klasy receptorów powierzchni komórki

Odmiennie niż hormony steroidowe i hormony tarczycy, ogromna większość cząsteczek sygnałowych jest hydrofilowymi białkami, peptydami i innymi cząsteczkami rozpuszczalnymi w wodzie, które nie są zdolne do przejścia przez błonę komórkową komórki docelowej. W związku z tym ich receptory muszą być białkami transbłonowymi, dzięki czemu mogą wykryć sygnał na zewnątrz komórki i przekazać informację przez błonę komórkową już w nowej formie do wnętrza komórki.

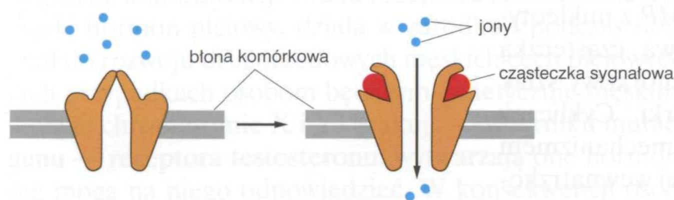
Większość białkowych receptorów powierzchni komórki należy do jednej z trzech dużych rodzin: *receptory związane z kanałami jonowymi* (**receptory jonotropowe**), *receptory współpracujące z białkami G* (**receptory metabotropowe**) i *receptory związane z enzymami* (**receptory katalityczne**)*. Te rodziny receptorów różnią się charakterem sygnału wewnątrzkomórkowego, który wytwarzają po związaniu zewnątrzkomórkowej cząsteczki sygnałowej. W przypadku receptorów jonotropowych sygnałem takim jest przepływ jonów, prowadzący do efektu elektrycznego. W przypadku receptorów metabotropowych wewnątrzkomórkowym sygnałem jest zaktywowana forma białka związanego z błoną od strony cytoplazmatycznej (*podjednostka białka G*), która uwolniona z nieruchomego kompleksu całego białka G dyfunduje w płaszczyźnie błony komórkowej, inicjując kaskadę innych efektów. W przypadku receptorów katalitycznych sygnałem wewnątrzkomórkowym jest wzbudzenie w cytoplazmatycznej domenie receptora aktywności enzymatycznej, wyzwalającej różnorodne dalsze sygnały, w tym cząsteczki uwalniane do cytozolu (rys. 15-12).

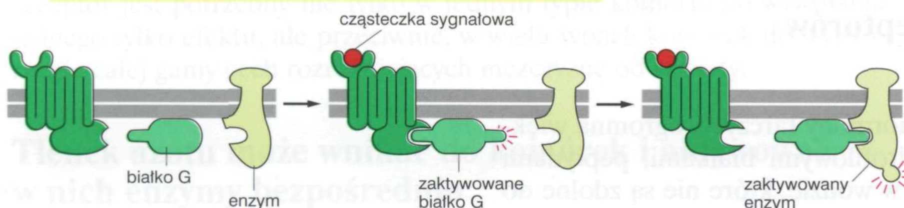
Liczba różnych typów tych trzech klas jest większa niż liczba działających na nie sygnałów zewnątrzkomórkowych, ponieważ dla wielu zewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych istnieje więcej niż jeden typ receptora. Na przykład przekaźnik nerwowy — acetylocholina — działa na komórki mięśnia szkieletowego poprzez receptor jonotropowy, natomiast w komórkach mięśnia sercowego działa on poprzez receptor metabotropowy (patrz rys. 15-5A i C). Te dwa typy receptorów wytwarzają odmienne sygnały wewnątrzkomórkowe, co umożliwia dwóm typom komórek mięśniowych reagowanie na acetylocholinę w różny sposób.

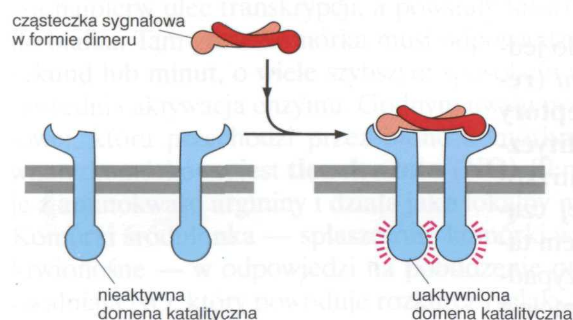
Wiele różnych receptorów powierzchni komórki, których organizm potrzebuje do swych własnych celów sygnalizacyjnych, jest również celem dla licznych substancji obcych, które zakłócają naszą fizjologię i odczucia, począwszy od heroiny i nikotyny, aż do leków uspokajających (sedatywnych) i przyprawy chili. Substancje te albo naśladują naturalny ligand i przez to zajmują w receptorze miejsce wiązania naturalnego liganda, albo wiążą się z receptorem w jakimś innym miejscu blokując lub zwiększając prawidło-

Pytanie 15-4. Mechanizmy sygnalizacyjne używane przez receptor hormonów steroidowych i przez receptor jonotropowy są bardzo proste i mają tylko niewiele składników. Czy mogą one prowadzić do amplifikacji początkowego sygnału, a jeśli tak, to w jaki sposób?

*Autor nie używa terminów podanych tu tłustym drukiem; wprowadzamy je do polskiego wydania, ponieważ są prostsze i często używane (*przyp. tłum.*).







Rys. 15-12. Trzy klasy receptorów w błonie komórkowej. (A) Receptor połączony z kanałem jonowym (receptor jonotropowy) otwiera się (lub zamyka, czego nie pokazano) w odpowiedzi na związanie swego liganda. (B) Gdy receptor współdziałający z białkiem G (receptor metabotropowy) zwiąże swój ligand, sygnał przechodzi na białko wiążące GTP (białko G), oddziałujące z receptorem. Następnie białko G opuszcza receptor i aktywuje enzym docelowy (lub kanał jonowy, czego nie pokazano) w błonie komórkowej. Dla uproszczenia białko G pokazano tu jako pojedynczą cząsteczkę; później zobaczymy, że w rzeczywistości jest ono kompleksem, który może dysocjować. (C) Receptor wykazujący aktywność enzymatyczną (receptor katalityczny) po związaniu zewnątrzkomórkowego liganda aktywuje domenę enzymatyczną przy drugim końcu receptora, po stronie cytoplazmatycznej. We wszystkich tych trzech klasach receptorów związanie cząsteczki sygnałowej powoduje w receptorze zmianę, która przekazuje informację dalej, bez potrzeby wnikania samej cząsteczki sygnałowej do komórki. (Według często stosowanej terminologii receptor typu A to receptor jonotropowy; B — metabotropowy; C — katalityczny, czego autor nie podaje – *przyp. tłum.*)

wą aktywność receptora. W ten sposób działa wiele leków i trucizn, a znaczna część przemysłu farmaceutycznego jest ukierunkowana na badanie substancji, które wywierałyby ściśle określone efekty właśnie przez wiązanie się ze specyficznym typem receptora powierzchni komórki.

Receptory jonotropowe zamieniają sygnały chemiczne w elektryczne

Receptory jonotropowe (*receptory związane z kanałami jonowymi*), znane również jako *kanały jonowe bramkowane przekaźnikami nerwowymi*, działają w sposób najprostszy i omówiono je w rozdz. 12. Receptory te służą szybkiemu przemieszczeniu sygnałów w synapsach układu nerwowego: przekształcają one sygnał chemiczny — dostarczany do zewnętrznej powierzchni komórki docelowej w formie pulsu przekaźnika nerwowego — bezpośrednio w sygnał elektryczny, w formie zmiany transbłonowego potencjału błony komórkowej. Po związaniu przekaźnika nerwowego receptor tego typu zmienia swą konformację tak, iż otwiera lub zamyka kanał, którym mogą przepływać przez błonę specyficzne typy jonów, takie jak Na^+, K^+, Ca^{2+} lub Cl^- (patrz rys. 15-12A). Napędzane swym gradientem elektrochemicznym jony te szybko wpływają do komórki lub z niej wypływają, powodując w ciągu milisekundy zmianę potencjału transbłonowego. To z kolei może uruchomić impuls nerwowy albo zmienić zdolność innych sygnałów do takiego uruchamiania. Specyficzne skutki ma tu

otwarcie kanałów Ca^{2+}, ponieważ zmiany w wewnątrzkomórkowym stężeniu Ca^{2+} mogą w sposób istotny wpływać na aktywność wielu enzymów; będzie o tym mowa w dalszej części rozdziału.

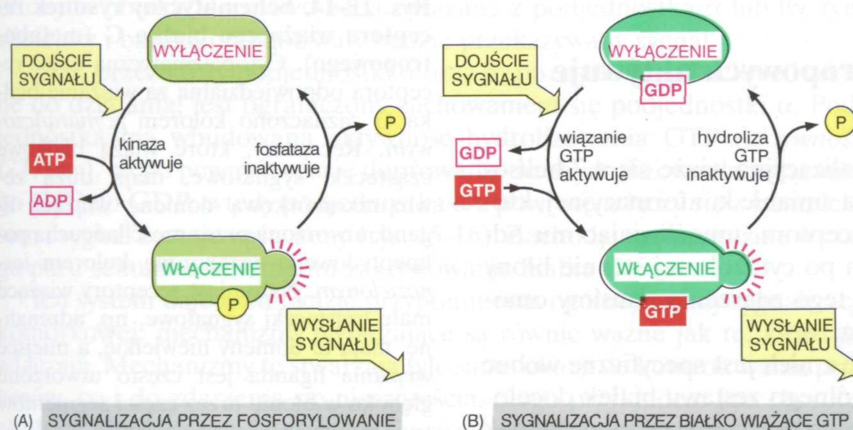
Wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacyjne działają jak seria przełączników molekularnych

O ile receptory jonotropowe są specjalnością układu nerwowego i innych komórek pobudliwych elektrycznie, np. mięśni, o tyle receptory metabotropowe i katalityczne są używane przez prawie wszystkie typy komórek organizmu. Właśnie tym ostatnim typom receptorów oraz zapoczątkowanym przez nie procesom przekazywania sygnałów będzie poświęcona pozostała część tego rozdziału.

Sygnały odbierane przez receptory metabotropowe i katalityczne są przenoszone dalej skomplikowanymi układami kaskad wewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnalizacyjnych. Poza kilkoma małymi cząsteczkami (takimi jak cykliczny GMP, cykliczny AMP i Ca^{2+}) te wewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnalizacyjne są białkami. Pewne z nich służą jako przekaźniki chemiczne, wytwarzając w odpowiedzi na dany sygnał chemiczny inny sygnał chemiczny; inne służą jako informatory ruchome („posłańcy"), obierając sygnał w jednej części komórki i przenosząc go do innej jej części, gdzie dopiero ujawni się ich efekt.

Większość kluczowych wewnątrzkomórkowych białek sygnalizacyjnych zachowuje się jak **przełączniki molekularne**: odebranie sygnału przełącza je ze stanu nieaktywnego w aktywny, po czym pozostają one w stanie aktywnym, dopóki jakiś inny proces ich nie wyłączy. Znaczenie procesu wyłączania jest często nie doceniane. Jeśli szlak sygnalizacyjny ma po przekazaniu sygnału powrócić do stanu wyjściowego i być gotowy do przekazania następnego sygnału, to każdy przełącznik molekularny musi powrócić do swego wyjściowego, nie wystymulowanego stanu. Tak więc na każdym etapie każdemu mechanizmowi aktywującemu musi odpowiadać mechanizm inaktywacji i oba są równie ważne dla funkcjonowania systemu.

Białka działające jak przełączniki molekularne zasadniczo dzielą się na dwie klasy. Pierwsza i największa klasa obejmuje białka, których aktywność jest włączana lub wyłączana przez fosforylację, o czym mówiono w rozdz. 5 (patrz rys. 5-36). Włączenie tych białek następuje działaniem kinazy białkowej, która dodaje do białka przełącznikowego grupę fosforanową, a wyłączenie zachodzi działaniem fosfatazy białkowej, która tę grupę usuwa (rys. 15-13A). Liczne białka przełącznikowe kontrolowane przez fosforylację są same w sobie kinazami białkowymi i są często zorga-



Rys. 15-13. Wewnątrzkomórkowe białka sygnalizacyjne działają jak przełączniki molekularne. W obu pokazanych przypadkach wewnątrzkomórkowe białko sygnalizacyjne jest aktywowane przez dodanie grupy fosforanowej, a inaktywowane przez usunięcie fosforanu. W (A) fosforan jest dołączany do białka kowalencyjnie przez kinazę białkową, która przenosi końcową grupę fosforanową z ATP na białko sygnalizacyjne. Fosforan jest usuwany przez fosfatazę białkową. W (B) białko sygnalizacyjne zostaje zmuszone do wymienienia związanego z nim GTP. Aktywność białka zostaje wyłączona przez hydrolizę związanego GTP do GDP

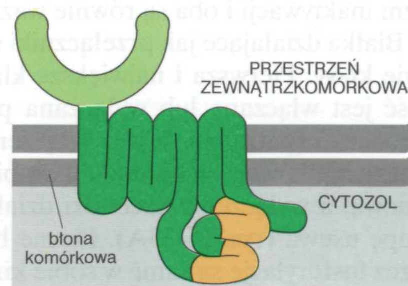
nizowane w *kaskady fosforylacyjne*: pierwsza kinaza białkowa zaktywowana przez ufosforylowanie fosforyluje następną w szeregu kinazę białkową, co powtarza się wielokrotnie podczas przenoszenia sygnału, powodując równocześnie jego amplifikację, rozprowadzenie i modulację.

Druga klasa białek przełącznikowych biorących udział w sygnalizacji obejmuje białka wiążące GTP. Aktywny lub nieaktywny stan takich białek zależy od tego, czy będzie z nimi związany GTP, czy GDP (rys. 15-13B); mechanizmy kontrolujące włączanie i wyłączanie będą omówione w następnym podrozdziale. Białka wiążące GTP są istotną częścią szlaków sygnalizacyjnych. Główną rolę w sygnalizacji poprzez receptory metabotropowe odgrywają białka G, o których będzie teraz mowa.

Receptory metabotropowe (współpracujące z białkami G)

Receptory współpracujące z białkami G (receptory metabotropowe) tworzą największą rodzinę receptorów powierzchni komórki i jak dotąd setki ich zidentyfikowano w komórkach ssaków. Pośredniczą one w powstawaniu odpowiedzi na ogromnie różnorodne zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe, w tym hormony, mediatory lokalne i przekaźniki nerwowe. Te cząsteczki sygnałowe są bardzo różne, zarówno w swej strukturze, jak i funkcji: mogą nimi być białka, krótkie peptydy lub pochodne aminokwasów i kwasów tłuszczowych, a dla każdej z nich istnieje odmienny receptor lub zestaw receptorów.

Pomimo różnorodności wiązanych cząsteczek sygnałowych, wszystkie współpracujące z białkami G receptory, które dotąd zbadano, mają podobną strukturę opartą na siedmiokrotnym przejściu pojedynczego łańcucha polipeptydowego przez dwuwarstwę lipidową (rys. 15-14). Nadrodzina białek receptorowych o siedmiu helisach transbłonowych obejmuje zarówno rodopsynę (aktywowane światłem białko fotoreceptorowe w oku kręgowców), jak i receptory zapachu w nosie kręgowców. Ich pochodzenie ewolucyjne musi być bardzo dawne, skoro receptory współdziałające z białkami G występują też u organizmów eukariotycznych, tak odległych od kręgowców jak drożdże. Strukturalnie są one podobne nawet do błonowych białek bakterii — takich jak bakteriorodopsyna, działająca jako napędzana światłem pompa H^+ (omówiona w rozdz. 11). Jednakże u bakterii takie białka nie działają jako receptory metabotropowe, bakterie nie mają bowiem białek G, a ich receptory powierzchniowe, którymi np. wyczuwają substancje odżywcze, są sprzężone z innymi systemami przekazywania sygnałów.

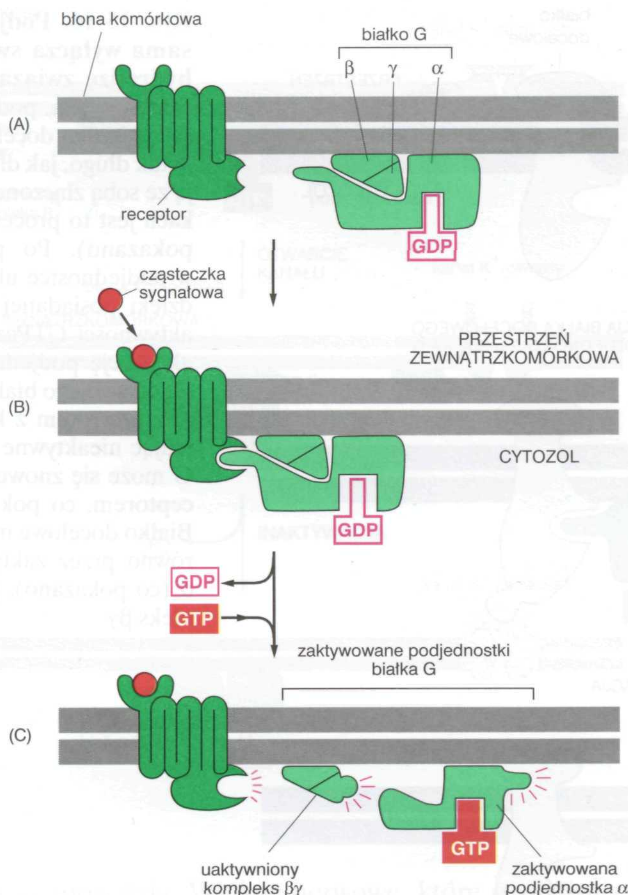


Rys. 15-14. Schematyczny rysunek receptora wiążącego białko G (metabotropowego). Cytoplazmatyczną część receptora odpowiedzialną za wiązanie białka G zaznaczono kolorem *pomarańczowym*. Receptory, które wiążą białkowe cząsteczki sygnałowe, mają dużą zewnątrzkomórkową domenę wiążącą ligand, utworzoną przez część łańcucha polipeptydowego zaznaczoną kolorem *jasnozielonym*. Natomiast receptory wiążące małe cząsteczki sygnałowe, np. adrenalinę, mają te domeny niewielkie, a miejsce wiązania liganda jest często utworzone głęboko w błonie przez części segmentów transbłonowych (nie pokazano)

Stymulacja receptorów metabotropowych aktywuje podjednostki białek G

Gdy zewnątrzkomórkowa cząsteczka sygnalizacyjna wiąże się z 7-helisowym receptorem błonowym, receptor ulega zmianie konformacyjnej, która odkształca cytoplazmatyczną stronę receptora, umożliwiając mu oddziaływanie z **białkiem G**, umieszczonym po cytozolowej stronie błony komórkowej. Aby wyjaśnić konsekwencję tego zdarzenia, musimy omówić budowę białek G i ich sposób działania.

Istnieją różne odmiany białek G. Każde z nich jest specyficzne wobec szczególnego zestawu receptorów i szczególnego zestawu białek docelowych leżących w dół szlaku informacyjnego, co wyjaśnimy później. Jednak

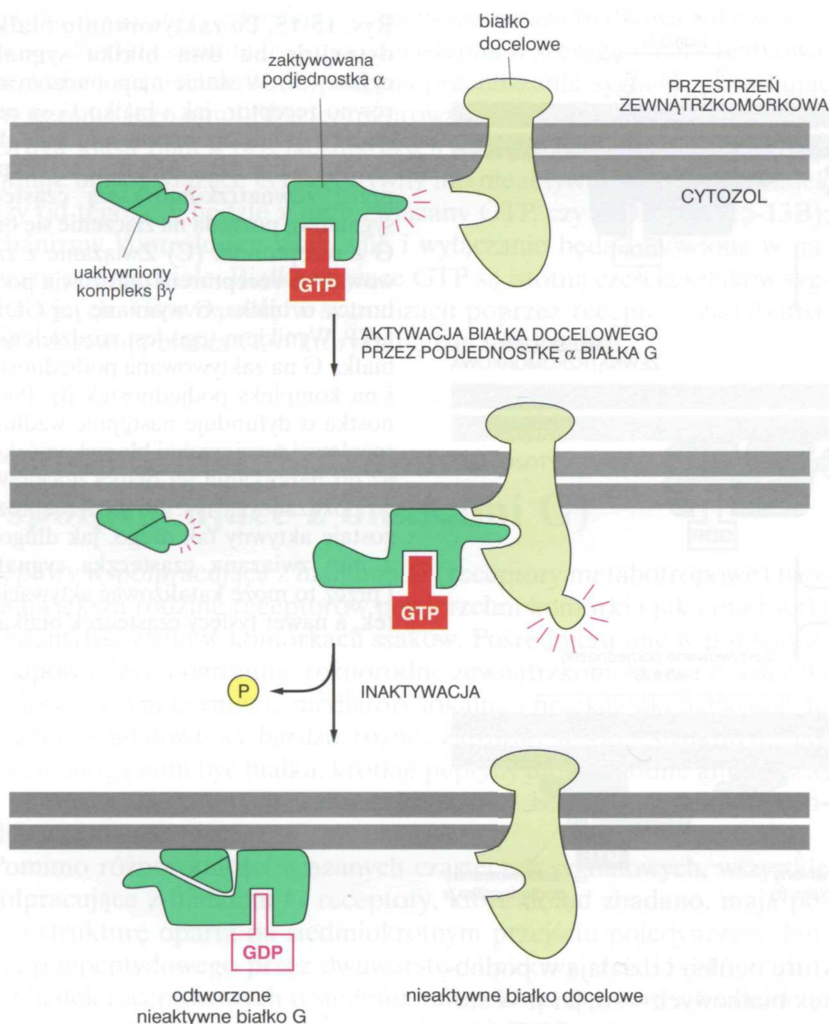


Rys. 15-15. Po zaktywowaniu białko G dysocjuje na dwa białka sygnalizacyjne. (A) W stanie niepobudzonym zarówno receptor, jak i białko G są nieaktywne i prawdopodobnie nie kontaktują się ze sobą. (B) Aktywacja receptora przez zewnątrzkomórkową cząsteczkę sygnałową pozwala na złączenie się białka G z receptorem. (C) Związanie z zaktywowanym receptorem umożliwia podjednostce α białka G wymianę jej GDP na GTP. Wynikiem tego jest rozdzielenie się białka G na zaktywowaną podjednostkę α i na kompleks podjednostek βγ. Podjednostka α dyfunduje następnie wzdłuż cytozolowej powierzchni błony komórkowej aż do napotkania jej białka docelowego, co pokazano na rys. 15-16. Receptor pozostaje aktywny tak długo, jak długo jest z nim związana cząsteczka sygnałowa i przez to może katalizować aktywację setek, a nawet tysięcy cząsteczek białka G

wszystkie te białka G mają podobną strukturę ogólną i działają w podobny sposób. Złożone są z trzech podjednostek białkowych — α, β i γ. W stanie niepobudzonym podjednostka α ma związany ze sobą GDP (rys. 15-15A), a całe białko G jest w stanie spoczynkowym. Gdy zewnątrzkomórkowy ligand wiąże się z receptorem, receptor wiąże się z białkiem G i aktywuje go przez zmuszenie podjednostki do odrzucenia związanego GDP i zastąpienia go przez GTP. Konsekwencją tego jest rozpad białka G na „włączoną" podjednostkę α ze związanym GTP oraz na kompleks βγ; powstają w ten sposób dwie oddzielne cząsteczki, które mogą swobodnie dyfundować wzdłuż błony (rys. 15-15B i C). Obie zaktywowane części białka G — tj. podjednostka α i kompleks βγ — mogą oddziaływać bezpośrednio z celami umieszczonymi w błonie komórkowej, które z kolei mogą przekazywać sygnał do jeszcze dalszych miejsc przeznaczenia. Im dłużej te obiekty docelowe będą związane z podjednostką α lub βγ, tym silniejszy i bardziej długotrwały będzie przekazywany sygnał.

Czas, przez który podjednostki α oraz βγ pozostaną rozdzielone i zdolne do działania, jest ograniczony zachowaniem się podjednostki α. Podjednostka ma wbudowaną aktywność hydrolizowania GTP (*aktywność GTPazy*), co po pewnym czasie doprowadzi do zhydrolizowania związanego GTP do GDP; wtedy podjednostka α z powrotem łączy się z kompleksem i sygnał zostaje wyłączony (rys. 15-16). Zachodzi to przeważnie w ciągu paru sekund od momentu zaktywowania białka G.

Ten system daje nam okazję przypomnienia ogólnej zasady sygnalizacji komórkowej: mechanizmy wyłączające są równie ważne jak te, które go włączają. Mechanizmy te stwarzają tyle samo okazji do kontrolowania procesów, co i do zdarzenia się nieszczęścia, czego przykładem jest choroba cholera. Cholerę wywołuje bakteria rozmnażająca się w jelicie, gdzie wy-



Rys. 15-16. Podjednostka α białka G sama wyłącza swą aktywność poprzez hydrolizę związanego z nią GTP. Gdy zaktywowana podjednostka α napotyka swoje białko docelowe, wiąże je i aktywuje tak długo, jak długo oba białka pozostają ze sobą złączone. (W pewnych przypadkach jest to proces inaktywacji, czego nie pokazano). Po paru sekundach GTP w podjednostce ulega hydrolizie do GDP dzięki posiadanej przez podjednostkę α aktywności GTPazowej. To powoduje inaktywację podjednostki α, która odłącza się od swojego białka docelowego i asocjuje z powrotem z kompleksem βγ, odtwarzając nieaktywne białko G. Teraz białko G może się znowu sprzęgnąć z innym receptorem, co pokazano na rys. 15-15 B. Białko docelowe może być regulowane zarówno przez zaktywowaną podjednostkę α (co pokazano), jak i przez wolny kompleks βγ

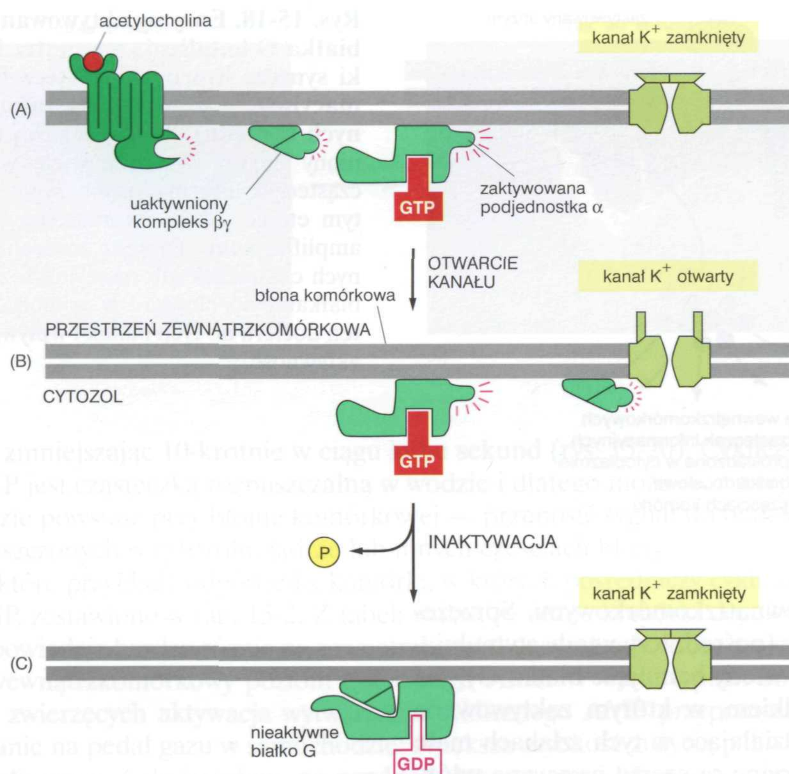
twarza ona białko o nazwie *toksyna cholery*. Wchodzi ono do komórek wyścielających jelito i modyfikuje podjednostkę α białka G tak, że nie może już ona hydrolizować związanego z nią GTP. Zmieniona podjednostka α pozostaje więc na zawsze w stanie aktywnym, stale przesyłając sygnał do jej białka docelowego. W komórkach jelita następuje ciągły wypływ Na^+ i wody do jelita, powodując ostrą biegunkę i odwodnienie często prowadzące do śmierci, jeśli nie przystąpi się do uzupełniania utraconej wody i jonów.

Pytanie 15-5. Receptory metabotropowe aktywują białka G przez zmniejszania ich siły wiązania GDP. Wynikiem jest szybkie oddysocjowanie związanego GDP i zastąpienie go przez GTP, który w cytozolu jest obecny w stężeniach znacznie większych niż GDP. Jakie konsekwencje wyniknęłyby z takiej mutacji w podjednostce α białka G, która zmniejszałaby powinowactwo tej podjednostki do GDP bez znaczącej zmiany jej powinowactwa do GTP? Porównaj efekt takiej mutacji z efektami działania toksyny cholery.

Pewne białka G regulują kanały jonowe

Białkami docelowymi dla podjednostek białek G są albo kanały jonowe, albo enzymy błonowe. Różne obiekty docelowe są kontrolowane przez różne typy białek G (których jak dotąd okryto w komórkach ssaków ok. 20), a te różne białka G są z kolei aktywowane przez różne klasy receptorów powierzchniowych. W ten sposób związanie zewnątrzkomórkowej cząsteczki sygnałowej z receptorem metabotropowym wywołuje efekty w szczególnych podgrupach licznych możliwych białek docelowych, odpowiadających temu sygnałowi i temu typowi komórki.

Przyjrzyjmy się najpierw przykładowi regulowania przez białko G kanałów jonowych. Rytm pracy serca jest kontrolowany przez dwa układy włókien nerwowych; aktywacja jednego układu przyspiesza ten rytm,



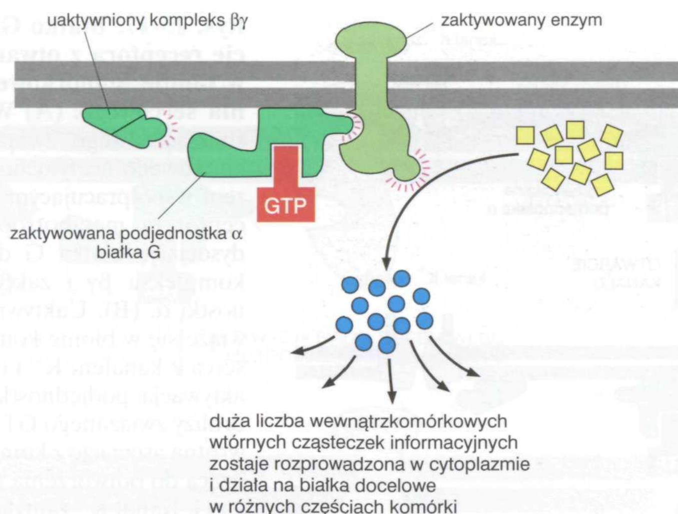
Rys. 15-17. Białko G sprzęga aktywację receptora z otwarciem kanału K^+ w błonie komórkowej komórki mięśnia sercowego. (A) W komórkach mięśnia sercowego związanie przekaźnika nerwowego acetylocholiny z jej receptorem współpracującym z białkiem G (receptorem metabotropowym) powoduje dysocjację białka G do zaktywowanego kompleksu βγ i zaktywowanej podjednostki α. (B). Uaktywniony kompleks βγ wiąże się w błonie komórkowej komórek serca z kanałem K^+ i otwiera go. (C) Inaktywacja podjednostki α w drodze hydrolizy związanego GTP powoduje jej powrotną asocjację z kompleksem βγ prowadzącą do odtworzenia nieaktywnego białka G. Kanał K^+ zamyka się

a aktywacja drugiego — spowalnia. Włókna nerwowe, które sygnalizują spowolnienie bicia serca, działają przez uwolnienie acetylocholiny, wiążącej się z receptorem metabotropowym komórek mięśnia sercowego. Po związaniu się acetylocholiny z receptorem, białko G ulega aktywacji, dysocjując na podjednostkę α i kompleks βγ (rys. 15-17A). W tym szczególnym przykładzie aktywnym komponentem sygnalizującym jest kompleks βγ: wiąże się on z cytozolową powierzchnią kanału K^+ w błonie komórkowej komórki mięśnia sercowego i zmusza ten kanał jonowy do przyjęcia konformacji otwartej (rys. 15-17B). Zmienia to elektryczne właściwości komórki mięśnia sercowego, zmniejszając częstotliwość skurczów. Działanie kompleksu βγ kończy się, a kanał K^+ z powrotem zamyka, gdy podjednostka zostanie zinaktywowana przez hydrolizę związanego z nią GTP i odtworzy kompleksową, nieaktywną formę białka G (rys. 15-17C).

Teraz rozważymy oddziaływanie białek G z ich innymi głównymi celami, enzymami mieszczącymi się w błonie komórkowej.

Pewne białka G aktywują enzymy błonowe

Oddziaływanie białek G z kanałami jonowymi powoduje natychmiastową zmianę w stanie i zachowaniu się komórki. Oddziaływanie tych białek z enzymami jako celami ma bardziej złożone konsekwencje, prowadząc do wytworzenia dalszych wewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnalizacyjnych. Najczęstszymi enzymami docelowymi dla białek G są: *cyklaza adenylanowa*, która jest odpowiedzialna za wytworzenie małej cząsteczki sygnalizacyjnej — *cyklicznego AMP*, oraz *fosfolipaza C*, odpowiedzialna za tworzenie małych jednostek sygnalizacyjnych — *trisfosforanu inozytolu* oraz *diacyloglicerolu*. Te dwa enzymy są aktywowane przez różne typy białek G, sprzęgające wytwarzanie małych wewnątrzkomórkowych cząsteczek syg-



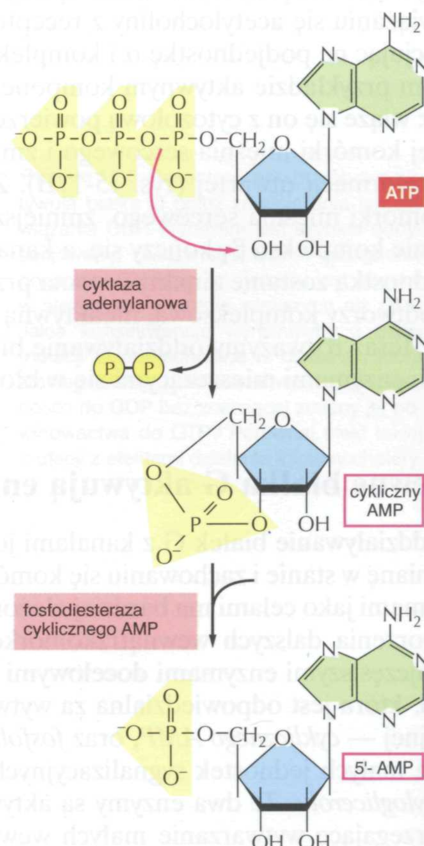
Rys. 15-18. Enzymy aktywowane przez białka G katalizują wewnątrz komórki syntezę wtórnych cząsteczek informacyjnych (= cząsteczek informacyjnych II rzędu). Ponieważ każdy uaktywniony enzym wytwarza wiele wtórnych cząsteczek informacyjnych, sygnał jest na tym etapie szlaku informacyjnego silnie amplifikowany. Poprzez związanie wtórnych cząsteczek informacyjnych z innymi białkami docelowymi w komórce sygnał ten dociera do tych białek i wpływa na ich aktywność

nalizacyjnych z odmiennymi sygnałami zewnątrzkomórkowymi. Sprzężenie może mieć charakter albo stymulujący (pośredniczy wtedy stymulujące białko G), albo hamujący (pośredniczy wtedy hamujące białko G); dla uproszczenia zajmiemy się tutaj przypadkiem, w którym zaktywowane białko G stymuluje aktywność enzymu. Działające w tych szlakach małe wewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnalizacyjne są często nazywane **wtórnymi cząsteczkami informacyjnymi** (ang. second messengers); odpowiednio, sygnały zewnątrzkomórkowe będą wtedy „pierwotnymi cząsteczkami informacyjnymi". Cząsteczki są wytwarzane w dużych ilościach przez zaktywowany enzym błonowy, a następnie szybko dyfundują z miejsca swego powstawania, roznosząc sygnał po całej komórce (rys. 15-18).

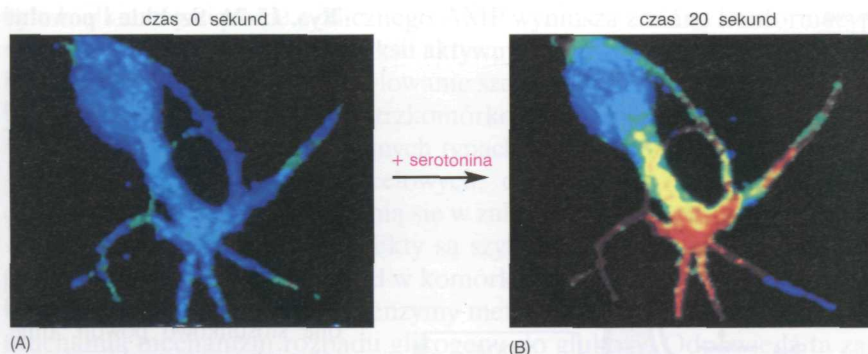
Najpierw omówimy konsekwencje zwiększenia stężenia cyklicznego AMP. To poprowadzi nas wzdłuż szlaków sygnalizacyjnych rozpoczynających się przy receptorach metabotropowych. Następnie zajmiemy się działaniem diacyloglicerolu i trisfosforanu inozytolu, co poprowadzi nas wzdłuż innego szlaku.

Szlak cyklicznego AMP może aktywować enzymy i włączać działanie genów

Wiele sygnałów zewnątrzkomórkowych działających poprzez receptory metabotropowe wpływa na aktywność **cyklazy adenylanowej** i przez to zmienia stężenie cząsteczki informacyjnej — **cyklicznego AMP** wewnątrz komórki. Najczęściej, uaktywniona podjednostka α białka G włącza cyklazę adenylanową, powodując silny i gwałtowny wzrost syntezy cyklicznego AMP z ATP, który jest w komórce zawsze obecny. Drugi enzym, *fosfodiesteraza cyklicznego AMP*, który jest ustawicznie aktywny, bardzo szybko rozkłada cykliczny AMP do zwykłego AMP (rys. 15-19). Ponieważ cykliczny AMP jest w komórce tak prędko rozkładany, jego stężenie może w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe sygnały szybko się zmieniać, zwiększając



Rys. 15-19. Synteza i degradacja cyklicznego AMP (cAMP). Cykliczny AMP powstaje z ATP przez reakcję cyklizacji, która usuwa z ATP dwie grupy fosforanowe i łączy „wolny" koniec pozostałej grupy fosforanowej z cukrową częścią wyjściowej cząsteczki ATP. Powstałe wiązanie może ulec hydrolizie katalizowanej przez fosfodiesterazę, co przekształca cAMP w 5′AMP



Rys. 15-20. Wzrost stężenia cyklicznego AMP w odpowiedzi na sygnał zewnątrzkomórkowy. Na sygnał, jakim jest związanie przekaźnika nerwowego — *serotoniny* — z receptorem współpracującym z białkiem G, hodowana *in vitro* komórka nerwowa odpowiada wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego AMP. Poziom wewnątrzkomórkowego cAMP można było śledzić dzięki wstrzyknięciu do komórki fluoryzującego białka, które po związaniu cAMP zmienia swą fluorescencję. Kolor *niebieski* wskazuje niski poziom cAMP, kolor *żółty* — poziom średni, a kolor *czerwony* — poziom wysoki. (A) W komórce spoczynkowej stężenie cAMP wynosi ok. $5 \cdot 10^{-8}$ M. (B) Po dwudziestu sekundach od dodania serotoniny do pożywki wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP wzrosło do wartości wyższej niż 10^{-6} M, a więc ponad dwudziestokrotnie. (Dzięki uprzejmości: Roger Tsien)

się lub zmniejszając 10-krotnie w ciągu kilku sekund (rys. 15-20). Cykliczny AMP jest cząsteczką rozpuszczalną w wodzie i dlatego może — z miejsca, gdzie powstaje przy błonie komórkowej — przenosić sygnał do białek rozmieszczonych w cytozolu, jądrze lub innych częściach błony.

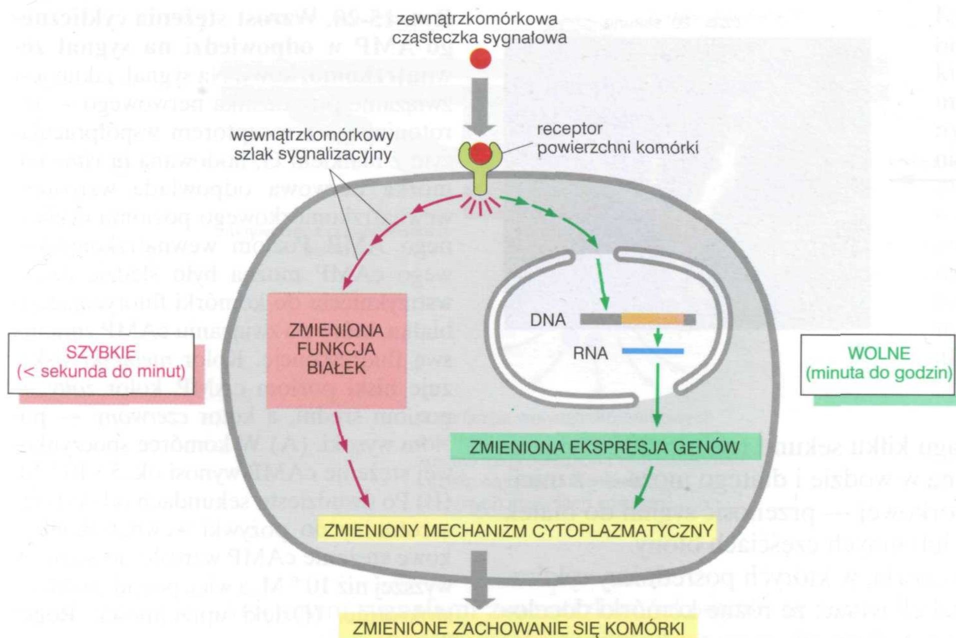
Niektóre przykłady odpowiedzi komórki, w których pośredniczy cykliczny AMP, zestawiono w tab. 15-2. Z tabeli widać, że różne komórki docelowe odpowiadają bardzo różnie na zewnątrzkomórkowe sygnały, które zmieniają wewnątrzkomórkowy poziom cyklicznego AMP. W wielu typach komórek zwierzęcych aktywacja wytwarzania cyklicznego AMP przypomina naciskanie na pedał gazu w samochodzie: zwiększa szybkość zużycia paliwa metabolicznego. Gdy jesteśmy, na przykład, przestraszeni lub podnieceni, nadnercze wydziela hormon adrenalinę, która krąży w krwiobiegu i wiąże się z określoną klasą receptorów metabotropowych — receptorami adrenergicznymi, obecnymi w wielu typach komórek. Konsekwencje różnią się w zależności od typu komórki, ale zawsze pomagają w przygotowaniu organizmu do szybkiego działania. Na przykład w mięśniu szkieletowym konsekwencją związania adrenaliny z jej receptorem jest zachodząca za pośrednictwem białka G stymulacja cyklazy adenylanowej i wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego AMP, powodujący rozpad glikogenu (spolimeryzowana, zapasowa forma glukozy), co udostępnia większe ilości glukozy jako paliwa potrzebnego do przewidywanej aktywności mięśni. Adrenalina działa również na komórki tłuszczowe przyspieszając rozpad triacylogliceroli (zapasowa forma tłuszczu) do kwasów tłuszczowych, które są formą paliwa komórkowego nadającą się do bezpośredniego użycia (co omówiono w rozdz. 4), a które mogą być eksportowane do innych komórek.

Cykliczny AMP wywołuje te różne efekty głównie dzięki temu, że działa na enzym *kinazę białkową zależną od cyklicznego AMP* (**kinazę A**): kinaza ta jest utrzymywana w stanie nieaktywnym w postaci kompleksu z in-

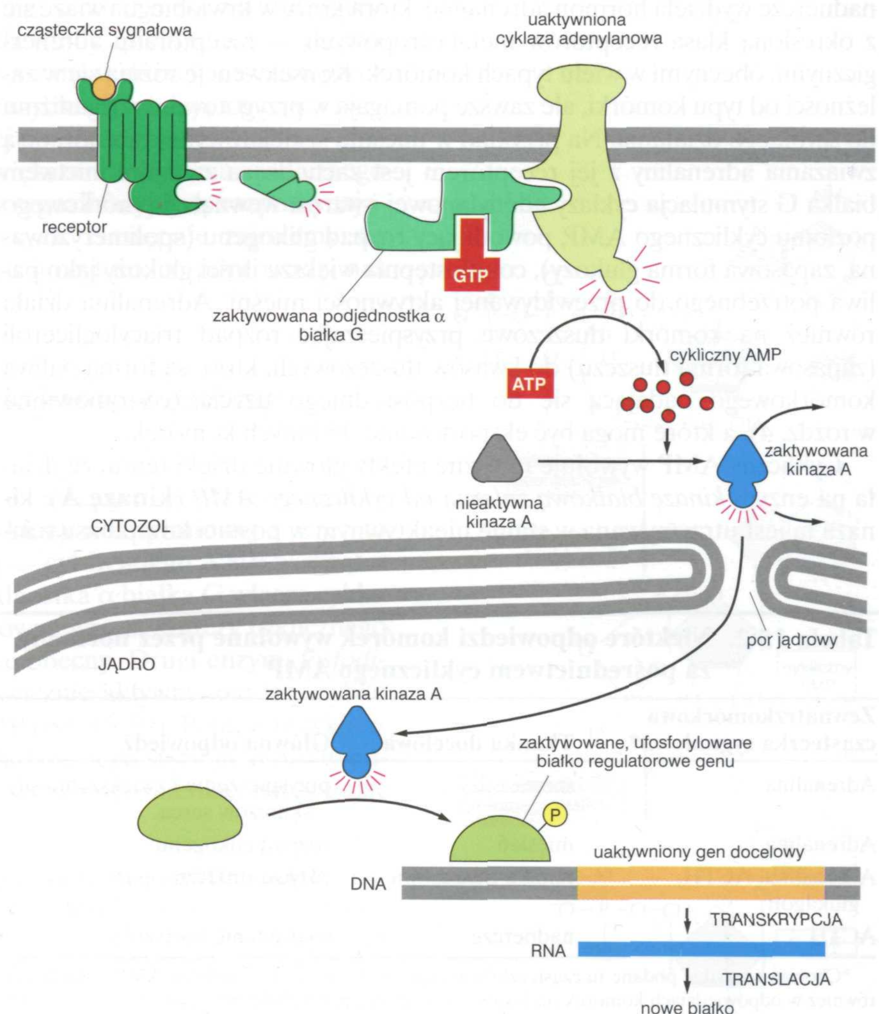
Tabela 15-2. Niektóre odpowiedzi komórek wywołane przez hormony za pośrednictwem cyklicznego AMP

Zewnątrzkomórkowa cząsteczka sygnałowa*	Tkanka docelowa	Główna odpowiedź
Adrenalina	serce	przyspieszenie i zwiększenie siły skurczów serca
Adrenalina	mięsień	rozpad glikogenu
Adrenalina, ACTH, glukagon	tkanka tłuszczowa	rozpad tłuszczu
ACTH	nadnercze	wydzielenie kortyzolu

*Chociaż wszystkie podane tu cząsteczki sygnałowe są hormonami, cykliczny AMP pośredniczy również w odpowiedziach komórek na lokalne mediatory i przekaźniki nerwowe.



Rys. 15-21. Szybkie i powolne odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe. Sygnały zewnątrzkomórkowe regulują wiele aspektów zachowania się komórki. Pewne typy zmienionych zachowań komórki, np. przyspieszony wzrost i podział, opierają się na zmianach ekspresji genów i syntezie nowych białek; dlatego też przebiegają one stosunkowo powoli. Inne, takie jak zmiany ruchliwości, sekrecji i metabolizmu, nie wymagają interwencji ze strony informacji genetycznej i dlatego zachodzą szybciej



Rys. 15-22. Aktywacja transkrypcji genu przez wzrost stężenia cyklicznego AMP. Związanie hormonu lub przekaźnika nerwowego do jego receptora współpracującego z białkiem G prowadzi do aktywacji cyklazy adenylanowej i podwyższenia poziomu cyklicznego AMP. Cykliczny AMP aktywuje w cytozolu kinazę A, która następnie przemieszcza się do jądra i fosforyluje białko regulatorowe genu. To ostatnie po ufosforylowaniu jest zdolne do stymulowania transkrypcji całego zestawu genów docelowych. Ten szlak sygnalizacyjny kontroluje w komórce wiele procesów: od syntezy hormonu w komórkach endokrynowych do wytwarzania w mózgu białka niezbędnego do długotrwałej pamięci

nym białkiem; związanie cyklicznego AMP wymusza zmianę konformacyjną, która uwalnia z tego kompleksu aktywny enzym. Następnie aktywna kinaza białkowa katalizuje fosforylowanie szczególnych reszt seryny i treoniny w pewnych białkach wewnątrzkomórkowych, zmieniając przez to aktywność tych białek. W odmiennych typach komórek fosforylowaniu ulegają inne zestawy białek docelowych, co tłumaczy, dlaczego efekty działania cyklicznego AMP różnią się w zależności od komórki docelowej.

W pewnych przypadkach efekty są szybkie, a w innych pojawiają się powoli (rys. 15-21). Na przykład w komórkach mięśni szkieletowych uaktywniona kinaza A fosforyluje enzymy metabolizujące glikogen, przez co uruchamia mechanizm rozpadu glikogenu do glukozy. Odpowiedź ta zachodzi w ciągu sekund. Na drugim biegunie znajdują się efekty działania cAMP, których ujawnienie się wymaga minut lub godzin. Ważną klasą efektów powolnych są te, które dotyczą zmian ekspresji genów. Na przykład w pewnych komórkach kinaza A fosforyluje regulatorowe białka genów, które aktywują transkrypcję wybranych genów. Na rysunku 15-22 pokazano rozległy łańcuch przekaźników takiego szlaku:

hormon → receptor o siedmiu helisach → białko G →
→ cyklaza adenylanowa → cykliczny AMP → kinaza A →
→ regulatorowe białko genu → transkrypcja genu

Omówiliśmy dotąd jedną gałąź szlaku sygnalizacyjnego prowadzącego od receptorów metabotropowych poprzez białko G i cyklazę adenylanową — od błony komórkowej do jądra komórki. Teraz musimy powrócić do błony komórkowej, aby prześledzić inny szlak sygnalizacyjny, w którym pośredniczą inne enzymy, a który zaczyna się od aktywacji przez receptory metabotropowe innego związanego z błoną enzymu — *fosfolipazy C*.

Pytanie 15-6. Wyjaśnij, dlaczego, aby umożliwić szybką sygnalizację, cykliczny GMP musi być w komórce prędko rozkładany.

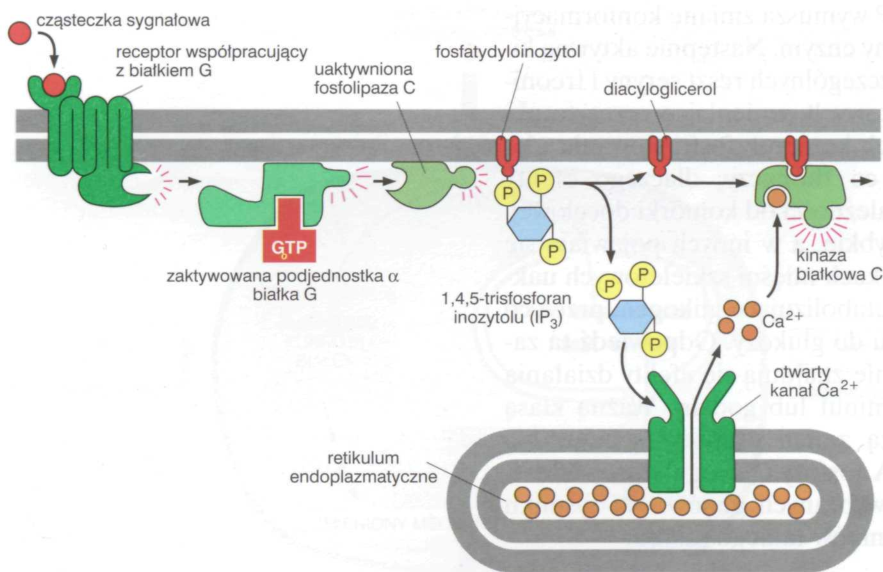
Szlak informacyjny wiodący przez fosfolipazę C prowadzi do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+}

Ponad 25 znanych receptorów metabotropowych działa poprzez specjalny typ białka G, który aktywuje związany z błoną enzym **fosfolipazę C**, a nie cyklazę adenylanową; kilka przykładów podano w tab. 15-3.

Fosfolipaza C działa na błonowy fosfolipid zawierający cukier inozytol — fosfatydyloinozytol, obecny w małych ilościach w cytoplazmatycznej warstwie lipidowej dwuwarstwy błony komórkowej. Właśnie od nazwy tego fosfolipidu szlak sygnalizacyjny rozpoczynający się działaniem fosfolipazy C często określa się jako *szlak fosfatydyloinozytolowy*. Fosfolipaza C tworzy dwie odrębne cząsteczki informacyjne. Odcina ona od fosfolipidu hydrofilową głowę, jaką jest fosforan cukru, uwalniając *1,4,5-trisfosforan*

Tabela 15-3. Niektóre odpowiedzi uruchamiane za pośrednictwem aktywacji fosfolipazy C

Pojedyncza cząsteczka	Tkanka docelowa	Główna odpowiedź
Wazopresyna (hormon białkowy)	wątroba	rozpad glikogenu
Acetylocholina	trzustka	wydzielenie amylazy (enzymu trawiennego)
Acetylocholina	mięsień gładki	skurcz
Trombina (enzym proteolityczny)	płytki krwi	agregacja



Rys. 15-23. Szlaki sygnalizacyjne aktywowane przez fosfolipazę C. Przez zhydrolizowanie zaktywowaną fosfolipazą C błonowego fosfatydyloinozytolu (fosfolipidu zawierającego inozytol) powstają wewnątrz komórki dwie wtórne cząsteczki informacyjne. 1,4,5-trisfosforan inozytolu (IP_3) dyfunduje w cytoplazmie i uwalnia Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego przez związanie się z kanałem Ca^{2+} w błonie retikulum endoplazmatycznego i otwarcie tego kanału. Stromy elektrochemiczny gradient Ca^{2+} powoduje szybkie wypływanie Ca^{2+} do cytozolu. Diacyloglicerol powstaje w błonie komórkowej i wraz z Ca^{2+} współdziała w aktywacji enzymu kinazy białkowej C, która podchodzi z cytoplazmy do cytozolowej powierzchni błony komórkowej

inozytolu (*IP_3*) i pozostawiając w błonie komórkowej ogon lipidu — *diacyloglicerol (DAG)*. Obie te cząsteczki odgrywają kluczową rolę w sygnalizacji wewnątrz komórki i o nich będziemy teraz mówić.

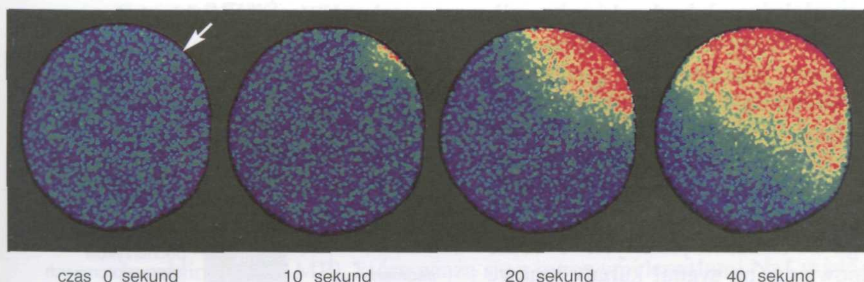
IP_3 opuszcza błonę komórkową i dyfunduje w cytozolu. Gdy dotrze do retikulum endoplazmatycznego, wiąże się z zawartymi w jego błonie kanałami Ca^{2+} i otwiera je. Zmagazynowany wewnątrz retikulum endoplazmatycznego Ca^{2+} szybko wypływa przez te otwarte kanały do cytozolu (rys. 15-23), gwałtownie zwiększając w nim stężenie wolnego Ca^{2+}, które w stanie spoczynkowym komórki jest bardzo małe.

Diacyloglicerol pozostaje w błonie komórkowej, gdzie bierze udział w aktywacji specyficznej kinazy białkowej. Ma ona nazwę *kinazy białkowej C* (**kinaza C**), ponieważ do swej aktywacji musi jeszcze związać Ca^{2+} (patrz rys. 15-23). Po zaktywowaniu kinaza C fosforyluje zestaw białek wewnątrzkomórkowych, odmienny w różnych typach komórek. Zasady działania są takie same jak w przypadku kinazy A, chociaż większość białek docelowych jest odmienna.

Sygnał Ca^{2+} uruchamia wiele procesów biologicznych

Ca^{2+} ma tak ważną i powszechną rolę jako wtórny informator wewnątrzcząsteczkowy, że musimy zrobić dygresję, aby rozważyć jego funkcje bardziej ogólnie. Podwyższenie poziomu wolnego Ca^{2+} w cytozolu zachodzi w odpowiedzi na wiele różnych sygnałów, nie tylko tych, które działają za pośrednictwem receptorów metabotropowych. Na przykład w komórce jajowej gwałtowny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+}, występujący w momencie zapłodnienia przez plemnik, uruchamia rozpoczęcie się rozwoju zarodkowego (rys. 15-24); w komórkach mięśniowych Ca^{2+} uruchamia skurcz, a w wielu komórkach wydzielniczych, łącznie z komórkami nerwowymi, uruchamia wydzielanie. Wszystkie te swoje działania Ca^{2+} przeprowadza przez wiązanie się z białkami wrażliwymi na Ca^{2+} i zmienianie ich aktywności.

W spoczynkowym stanie komórki stężenie wolnego Ca^{2+} w cytozolu jest niezwykle małe (10^{-7} M) w porównaniu ze stężeniem tego jonu w płynie zewnątrzkomórkowym i w retikulum endoplazmatycznym. Różnice te są utrzymywane działaniem pomp błonowych, które aktywnie wypompo-

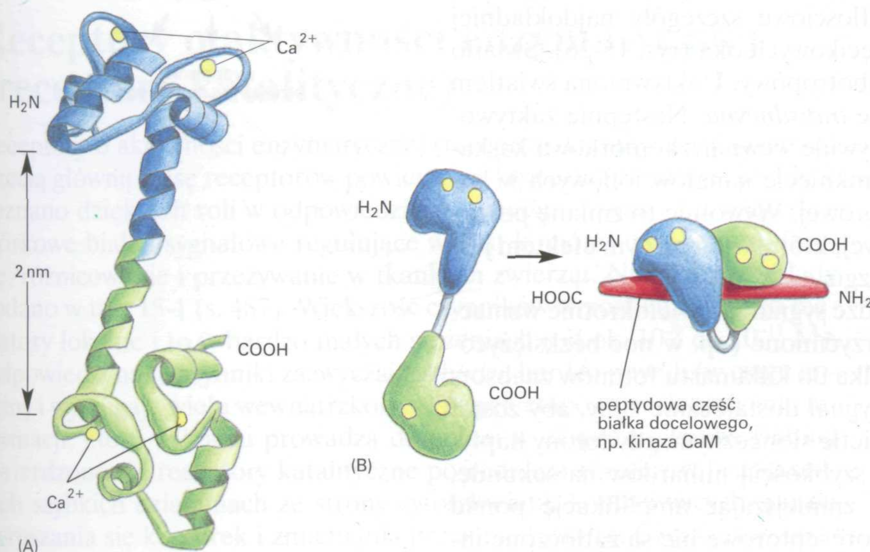


Rys. 15-24. Zapłodnienie komórki jajowej przez plemnik uruchamia szybki wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu. Do pokazanej komórki jajowej rozgwiazdy wstrzyknięto — przed jej zapłodnieniem — barwnik fluorescencyjny wrażliwy na Ca^{2+}. Widać falę cytozolowego Ca^{2+} (kolor *czerwony*), uwolnionego z retikulum endoplazmatycznego, która rozlewa się w komórce jajowej począwszy od miejsca wniknięcia plemnika (*strzałka*). Ta fala Ca^{2+} wywołuje w błonie komórkowej jaja zmianę zapobiegającą wniknięciu innego plemnika oraz inicjuje rozwój embrionalny. (Dzięki uprzejmości: Stephen A. Stricker)

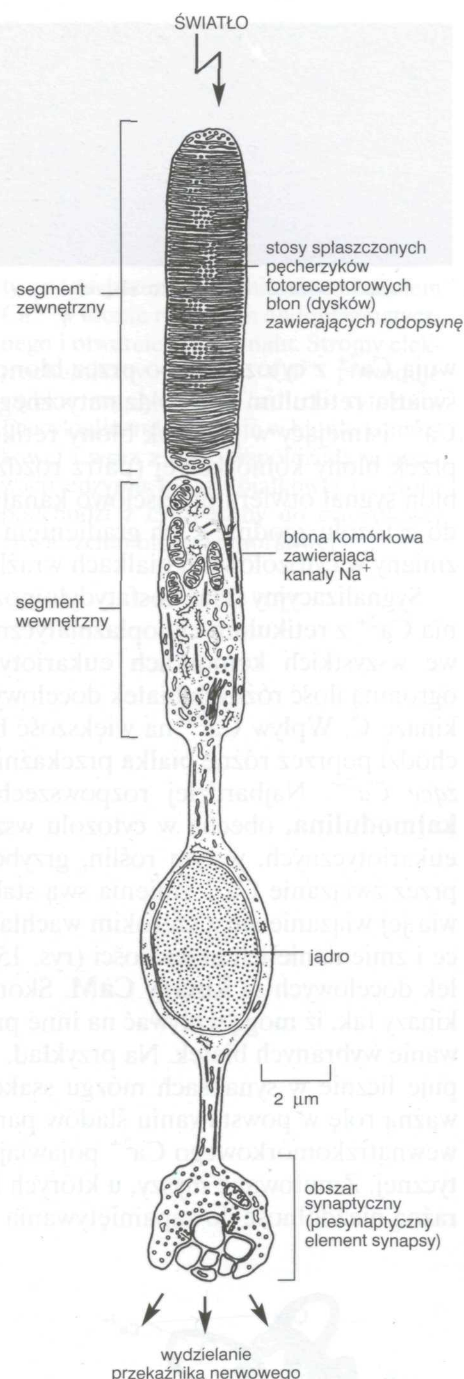
wują Ca^{2+} z cytozolu albo przez błonę komórkową na zewnątrz, albo do światła retikulum endoplazmatycznego. Wynikiem jest stromy gradient Ca^{2+} istniejący w poprzek błony retikulum endoplazmatycznego i w poprzek błony komórkowej (patrz rozdz. 12). Gdy w którejkolwiek z tych błon sygnał otwiera przejściowo kanały Ca^{2+}, jony Ca^{2+} szybko wpływają do cytozolu zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym i uruchamiają zmiany w cytozolowych białkach wrażliwych na Ca^{2+}.

Sygnalizacyjny szlak fosfatydyloinozytolowy, prowadzący do wydzielenia Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego do cytozolu, występuje prawie we wszystkich komórkach eukariotycznych i oddziałuje zarówno na ogromną ilość różnych białek docelowych, jak i na wspomnianą wcześniej kinazę C. Wpływ Ca^{2+} na większość białek ma charakter pośredni i zachodzi poprzez różne białka przekaźnikowe o ogólnej nazwie *białka wiążące Ca^{2+}*. Najbardziej rozpowszechnionym białkiem tego typu jest **kalmodulina,** obecna w cytozolu wszystkich badanych dotąd komórek eukariotycznych, w tym roślin, grzybów i pierwotniaków. Kalmodulina przez związanie Ca^{2+} zmienia swą stabilność konformacyjną, co umożliwia jej wiązanie się z szerokim wachlarzem docelowych białek w komórce i zmienianie ich aktywności (rys. 15-25). Szczególnie ważną klasą białek docelowych są **kinazy CaM**. Skompleksowanie z Ca^{2+} uaktywnia te kinazy tak, iż mogą wpływać na inne procesy komórkowe przez fosforylowanie wybranych białek. Na przykład, specyficzny typ kinazy CaM występuje licznie w synapsach mózgu ssaków, gdzie, jak się uważa, odgrywa ważną rolę w powstawaniu śladów pamięciowych w odpowiedzi na pulsy wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} pojawiające się podczas sygnalizacji synaptycznej. Zmutowane myszy, u których brak tej kinazy CaM, wykazują wyraźną niezdolność do zapamiętywania położenia przedmiotów.

Pytanie 15-7. Dlaczego w komórkach wytworzyły się wewnątrzkomórkowe magazyny Ca^{2+}, chociaż na zewnątrz komórki Ca^{2+} zazwyczaj nie jest czynnikiem ograniczającym?



Rys. 15-25. Struktura kompleksu kalmoduliny z Ca^{2+} oparta na wynikach badań z użyciem NMR i dyfrakcji promieni rentgenowskich. (A) Cząsteczka kalmoduliny ma kształt hantli o dwóch globularnych końcach połączonych długą, giętką α helisą. Każdy z dwóch końców cząsteczki ma dwie domeny wiążące Ca^{2+}. (B) Stosując uproszczoną strukturę pokazano zmiany konformacyjne w kompleksie Ca^{2+}–kalmodulina, zachodzące po jego związaniu się z białkiem docelowym. Warto zwrócić uwagę, że α helisa składa się wokół białka docelowego jak scyzoryk. (A — oparto na danych krystalograficznych uzyskanych analizą promieni rentgenowskich — wg: Y. S. Babu et al., *Nature* 315: 37–40, 1985. © 1985 Macmillan Magazines Ltd.; B — oparto na danych krystalograficznych uzyskanych analizą promieni rentgenowskich — wg: W. E. Meador, A. R. Means, F. A. Quiocho, *Science* 257: 1251–1255, 1992 oraz na wynikach analiz NMR — wg: M. Ikura et al., *Science* 256: 632–638, 1992. © 1992 the AAAS)



Rys. 15-26. Pręcikowa komórka fotoreceptorowa siatkówki. Pochłaniające światło cząsteczki rodopsyny tkwią w błonach spłaszczonych pęcherzyków (dysków) ustawionych pionowo jak stos monet w środku zewnętrznego segmentu komórki; przekaźnik nerwowy jest wydzielany z przeciwległego końca komórki, a jego funkcją jest kontrola inicjacji impulsów w komórkach nerwu wzrokowego, które przewodzą sygnał do mózgu. Gdy komórka pręcika zostaje pobudzona światłem, sygnał przenoszony jest z cząsteczek rodopsyny w dyskach poprzez cytozol segmentu zewnętrznego do kanałów jonowych w błonie komórkowej tego segmentu. W odpowiedzi na sygnał kanały jonowe zamykają się, co zmienia (podwyższa) transbłonowy potencjał komórki pręcika. Mechanizmami podobnymi do tych, które kontrolują wydzielanie przekaźnika nerwowego w zwykłych komórkach nerwowych, zmiana potencjału transbłonowego modyfikuje szybkość przekaźnika nerwowego w synaptycznym obszarze komórki. (Zaadaptowano z: T. L. Leutz, Cell Fine Structure. Philadelphia: Saunders, 1971)

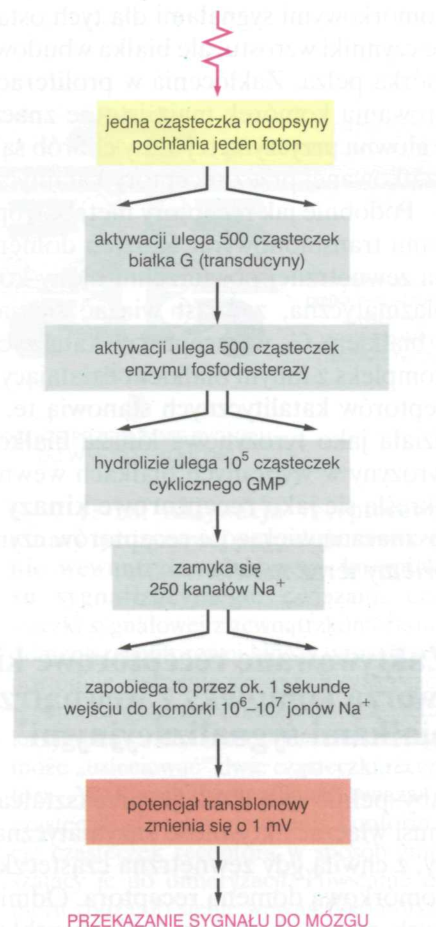
Wewnątrzkomórkowe kaskady sygnalizacyjne mogą osiągnąć zadziwiającą szybkość, wrażliwość i zdolność adaptacji: fotoreceptory w oku

Opis działania etapów kaskad sygnalizacyjnych związanych z receptorami metabotropowymi zajmuje wiele czasu, ale ich przebieg trwa tylko sekundy. Popatrzmy, jak szybko przerażenie może przyspieszyć bicie naszego serca (adrenalina stymuluje receptory metabotropowe w komórkach mięśnia sercowego w kierunku przyspieszenia rytmu pracy serca) lub jak szybko zapach dobrego jedzenia może wywołać wydzielanie śliny (przez pobudzenie w naszym nosie metabotropowych receptorów zapachów oraz, w komórkach sekrecyjnych, pobudzenie receptorów metabotropowych dla acetylocholiny, wywołujących sekrecję). Jedna z najszybszych odpowiedzi, w której pośredniczy receptor współpracujący z białkiem G, to odpowiedź oka na jasne światło: tylko 20 milisekund potrzebują najszybciej reagujące fotoreceptorowe komórki siatkówki (fotoreceptory czopkowe) do elektrycznego zareagowania na nagły błysk światła.

Szybkość taka jest uzyskiwana mimo niezbędnej wielostopniowości przekazywania sygnału w kaskadzie wewnątrzkomórkowej. Fotoreceptory stanowią poza tym doskonałą ilustrację postępu, jaki nastąpił w kaskadach sygnalizacyjnych, zwłaszcza w zakresie wyjątkowej amplifikacji, którą mogą one osiągnąć, oraz adaptacyjnej zdolności wykrywania sygnałów o szerokim zakresie intensywności. Ilościowe szczegóły najdokładniej przebadano w przypadku komórek pręcikowych oka (rys. 15-26). Światło działa tu na rodopsynę, receptor metabotropowy. Uaktywniona światłem rodopsyna aktywuje białko G o nazwie *transducyna*. Następnie zaktywowana podjednostka α transducyny aktywuje wewnątrzkomórkową kaskadę sygnalizacyjną, która powoduje zamknięcie kanałów jonowych w komórkowej błonie komórki fotoreceptorowej. Wywołuje to zmianę potencjału transbłonowego błony komórkowej, której ostatecznym efektem jest przesłanie impulsu nerwowego do mózgu.

W trakcie przekazywania na tej drodze sygnał jest wielokrotnie wzmacniany (rys. 15-27). Gdy światło jest przyćmione (np. w noc bezksiężycową), amplifikacja jest ogromna i już kilka do kilkunastu fotonów zaabsorbowanych w całej siatkówce wywoła sygnał dostatecznie silny, aby został dostarczony do mózgu. Przy silnym świetle słonecznym, gdy fotony napływają do komórki fotoreceptorowej z szybkością miliardów na sekundę, kaskada sygnalizacyjna *adaptuje się*, zmniejszając amplifikację ponad 10000 razy, dzięki czemu komórki fotoreceptorowe nie są zatłoczone in-

Rys. 15-27. Amplifikacja w sygnalizacyjnej kaskadzie zainicjowanej światłem w pręcikowych komórkach fotoreceptorowych. Rysunek przedstawia amplifikację, którą można uzyskać, gdy fotoreceptor jest zaadaptowany do przyćmionego światła. Wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny rozpoczynający się od specyficznego białka G — transducyny — przebiega elementami różnymi od tych, które wchodzą w skład szlaków dotąd opisanych. W nieobecności sygnału świetlnego w komórce fotoreceptorowej są ustawicznie wytwarzane wtórne cząsteczki sygnalizacyjne cyklicznego GMP (cząsteczki bardzo podobnej do cyklicznego AMP), które wiążą się z jonowymi kanałami Na^+ w błonie komórkowej tej komórki, utrzymując te kanały w stanie otwartym. Aktywacja rodopsyny przez światło powoduje powstanie aktywnych podjednostek α transducyny. Te z kolei aktywują enzym o nazwie fosfodiesteraza cyklicznych nukleotydów, która rozkłada cykliczny GMP do GMP. Gwałtowny spadek wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego GMP powoduje oddysocjowanie cyklicznego GMP od kanałów, które wtedy zamykają się. *Rozgałęzione strzałki* zaznaczają etapy, w których zachodzi amplifikacja



formacją i w dalszym ciągu mogą rejestrować wzrosty i spadki intensywności silnego światła. Adaptacja polega na ujemnym sprzężeniu zwrotnym: intensywna odpowiedź wytwarza w komórce fotoreceptorowej wewnątrzkomórkowy sygnał (zmianę w stężeniu Ca^{2+}), który hamuje enzymy odpowiedzialne za amplifikację sygnału.

Adaptacja występuje także w szlakach sygnalizacyjnych odpowiadających na sygnały chemiczne, co pozwala komórce na zachowanie wrażliwości na zmiany intensywności sygnału w szerokim zakresie poziomu tła tych zmian. Innymi słowy adaptacja sprawia, że komórka jest wrażliwa na informacje przekazane zarówno szeptem, jak i krzykiem.

Poza procesem widzenia również odczuwanie smaku i zapachu zależy od receptorów współpracujących z białkami G. Jest bardzo prawdopodobne, że ten mechanizm odbierania sygnałów, powstały we wczesnym etapie ewolucji eukariotów, ma swoje źródło w podstawowej i uniwersalnej potrzebie komórek do wyczuwania swego środowiska i odpowiadania na nie. Obecnie przejdziemy do innej klasy receptorów powierzchni komórki, które odgrywają kluczową rolę w kontrolowaniu liczebności komórek, ich różnicowaniu i ruchach w wielokomórkowym organizmie zwierzęcym.

Pytanie 15-8. Ważną cechą jakiejkolwiek kaskady sygnalizacyjnej jest jej zdolność wyłączenia się. Rozważmy kaskadę przedstawioną na rys. 15-27. Gdzie konieczne będą wyłączniki? Który z nich będzie najważniejszy?

Receptory o aktywności enzymatycznej (receptory katalityczne)

Receptory o aktywności enzymatycznej (receptory katalityczne), tworzące trzecią główną klasę receptorów powierzchni komórki (patrz. rys. 15-12C), poznano dzięki ich roli w odpowiedzi na *czynniki wzrostu* — zewnątrzkomórkowe białka sygnałowe regulujące wzrost komórki oraz jej proliferację, różnicowanie i przeżywanie w tkankach zwierząt. Niektóre przykłady podano w tab. 15-1 (s. 487). Większość czynników wzrostu działa jako mediatory lokalne i to w bardzo małych stężeniach (od ok. 10^{-9} do 10^{-11} M). Odpowiedzi na te czynniki zazwyczaj zachodzą bardzo powoli (w ciągu godzin) i wymagają wielu wewnątrzkomórkowych etapów przekształcania informacji, które w końcu prowadzą do zmian w ekspresji genów. Później stwierdzono, że receptory katalityczne pośredniczą również w bezpośrednich szybkich działaniach ze strony cytoszkieletu, kontrolujących sposób poruszania się komórek i zmieniania przez nie kształtu. Często zewnątrz-

komórkowymi sygnałami dla tych ostatnich odpowiedzi nie są dyfundujące czynniki wzrostu, ale białka wbudowane w powierzchnie, po których komórka pełza. Zakłócenia w proliferacji, różnicowaniu, przeżywaniu i migrowaniu komórek mają istotne znaczenie w powstawaniu nowotworów, a główną przyczyną tej klasy chorób są nieprawidłowości sygnalizacji zapoczątkowanej przez receptory katalityczne.

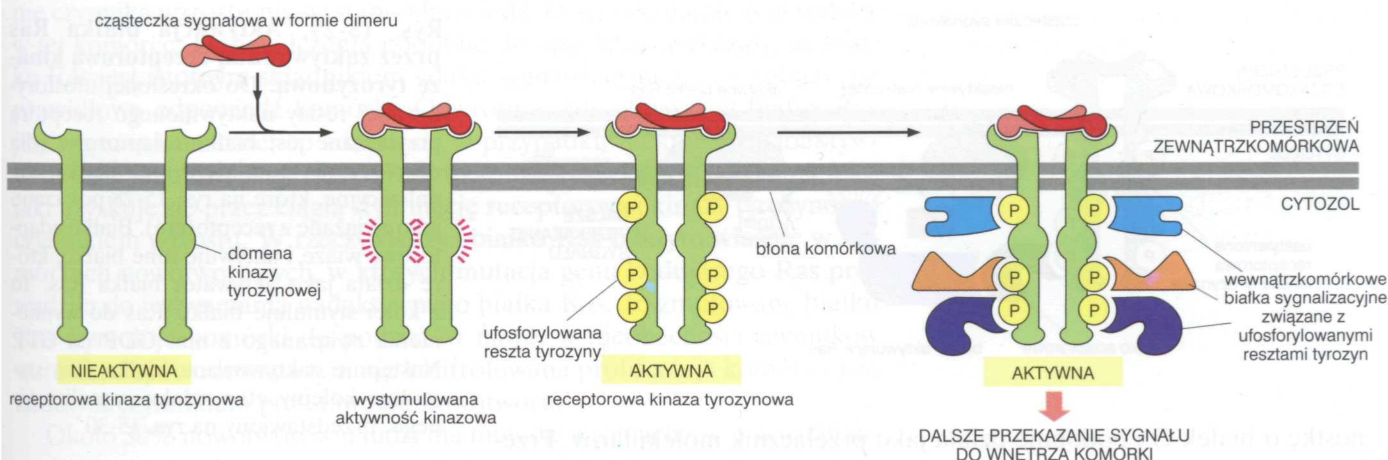
Podobnie jak receptory metabotropowe, receptory katalityczne są białkami transbłonowymi, których domeny wiążące ligandy są eksponowane na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Jednakże domena cytoplazmatyczna, zamiast wiązać się jak w receptorze metabotropowym z białkiem G, w receptorze katalitycznym działa jak enzym lub tworzy kompleks z innym białkiem działającym jako enzym. Największą klasę receptorów katalitycznych stanowią te, których domena cytoplazmatyczna działa jako tyrozynowa kinaza białkowa, fosforylująca boczne łańcuchy tyrozyny w wybranych białkach wewnątrzkomórkowych. Takie receptory określa się jako **receptorowe kinazy tyrozynowe**. Do tej kategorii należy znaczna większość receptorów czynników wzrostu i o nich właśnie będziemy teraz mówić.

Zaktywowane receptorowe kinazy tyrozynowe tworzą kompleks z wewnątrzkomórkowymi białkami sygnalizacyjnymi*

Aby pełnić swą funkcję przekształcania sygnału, receptor katalityczny musi włączać aktywność enzymatyczną swej wewnątrzkomórkowej domeny, z chwilą gdy zewnętrzna cząsteczka sygnałowa zwiąże się z zewnątrzkomórkową domeną receptora. Odmiennie od receptorów metabotropowych mających siedem helis transbłonowych, białka receptorów katalitycznych mają zazwyczaj tylko jeden segment transbłonowy przechodzący przez dwuwarstwę lipidową w formie α helisy. Wydaje się, że zmiana konformacyjna nie można być przenoszona przez pojedynczą α helisę i dlatego receptory katalityczne używają odmiennego mechanizmu do przekształcenia sygnału zewnątrzkomórkowego. Związanie cząsteczki sygnałowej powoduje zbliżenie się w błonie dwóch cząsteczek receptora i wytworzenie ich dimeru. Powstający w ten sposób kontakt między dwoma przyległymi cytoplazmatycznymi domenami receptorów aktywuje ich funkcję kinazową, czego rezultatem jest wzajemne ich ufosforylowanie.

Ufosforylowanie to umożliwia powstanie przy cytozolowych domenach receptorów złożonego wewnątrzkomórkowego kompleksu sygnalizacyjnego. Nowo ufosforylowane reszty tyrozynowe stają się miejscami wiązania całego zbioru wewnątrzkomórkowych białek sygnalizacyjnych — być może 10–20 różnych cząsteczek — które po związaniu same ulegają aktywacji. W czasie swego trwania taki kompleks sygnalizacyjny wysyła sygnały równocześnie po kilku szlakach prowadzących do różnych miejsc w komórce, a przez to aktywuje i koordynuje liczne zmiany biochemiczne potrzebne do włączenia takich kompleksowych odpowiedzi, jak proliferacja komórki

*Wobec skomplikowanej i nie ustalonej jeszcze polskiej terminologii działania szlaków sygnalizacyjnych i tworzących je elementów zastosowano tu następujące rozróżnienie. Cząsteczki dochodzące jako sygnały z zewnątrz komórki nazwano cząsteczkami sygnałowymi. Cząsteczki przejmujące sygnalizację wewnątrz komórki nazwano cząsteczkami sygnalizacyjnymi. Tak więc glukagon jest cząsteczką sygnałową, natomiast podjednostka α białka G jest cząsteczką sygnalizacyjną, podobnie jak białko Ras i inne. Cząsteczki sygnalizacyjne dyfundujące w cytoplazmie na większe odległości nazwano wtórnymi cząsteczkami informacyjnymi (ang. messenger molecules); są nimi np. cAMP, cGMP, trisfosforan inozytolu i — w pewnym sensie — jony Ca^{2+} (*przyp. tłum.*).



Rys. 15-28. Aktywacja receptorowej kinazy tyrozynowej powoduje utworzenie wewnątrzkomórkowego kompleksu sygnalizacyjnego. Związanie cząsteczki sygnałowej z zewnątrzkomórkową domeną receptorowej kinazy tyrozynowej powoduje złączenie się dwóch cząsteczek receptora w dimer. Pokazana tu cząsteczka sygnałowa sama jest dimerem i dlatego może „usieciować" dwie cząsteczki receptora. W innych przypadkach związanie cząsteczki sygnałowej zmienia konformację cząsteczek receptora w sposób zmuszający je do dimeryzacji. Powstanie dimeru zbliża do siebie wewnątrzkomórkowe domeny kinazowe obu receptorów, co aktywuje kinazy i umożliwia im wzajemne fosforylowanie kilku bocznych łańcuchów tyrozynowych. Każda ufosforylowana tyrozyna służy jako specyficzne miejsce wiążące dla różnych wewnątrzkomórkowych białek sygnalizacyjnych, które przekazują wejściowy sygnał do wnętrza komórki

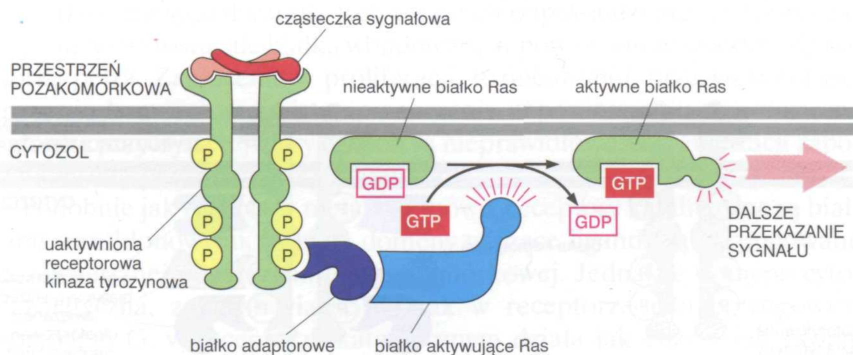
(rys. 15-28). W celu zakończenia aktywacji receptora komórka dysponuje *fosfatazami tyrozynowymi białek*, które usuwają grupy fosforanowe dodane do niego uprzednio w odpowiedzi na sygnał zewnątrzkomórkowy. W wielu przypadkach komórka pozbywa się zaktywowanych receptorów w sposób bardziej brutalny, przez wprowadzanie ich do swego wnętrza w drodze endocytozy, a następnie zniszczenie ich przez strawienie w lizosomach.

Różne receptorowe kinazy tyrozynowe skupiają przy sobie różne zbiory wewnątrzkomórkowych białek sygnalizacyjnych, wytwarzając odmienne efekty. Jednak niektóre z tych składników mają, jak się wydaje, bardzo szerokie zastosowanie; dotyczy to np. specyficznej fosfolipazy, która funkcjonuje w ten sam sposób jak fosfolipaza C, aktywując sygnalizacyjny szlak fosfatydyloinozytolowy (patrz. rys. 15-23). Jednakże główny szlak sygnalizacyjny, prowadzący od receptorowych kinaz tyrozynowych do jądra, przyjmuje inną drogę, która stała się bardzo znana z przykrego powodu: mutacje aktywujące ten szlak i dlatego niewłaściwie stymulujące podziały komórek są przyczyną wielu typów nowotworów. Naszą dyskusję o receptorowych kinazach tyrozynowych zakończymy omówieniem tego właśnie szlaku prowadzącego do jądra komórki.

Receptorowe kinazy tyrozynowe aktywują białko Ras, wiążące GTP

Pośród wewnątrzkomórkowych białek sygnalizacyjnych wiążących się z uaktywnionymi receptorowymi kinazami tyrozynowymi są takie, które działają jak fizyczne *adaptory*, umożliwiające powstawanie większych agregatów przez sprzęganie receptora z innymi białkami, które z kolei mogą się wiązać z jeszcze innymi białkami i aktywując je przesyłać sygnał dalej. Poprzez wiążące działanie tego typu kompleksu aktywacja receptorowej kinazy tyrozynowej prowadzi do aktywacji małego białka wewnątrzkomórkowego, **Ras,** zakotwiczonego w cytoplazmatycznej monowarstwie błony komórkowej. W zasadzie w ten sposób są sprzężone z białkiem Ras wszystkie receptorowe kinazy tyrozynowe począwszy od tych, które reagują na pochodzący z płytek krwi czynnik wzrostu (PDGF) i prowadzą od efektów takich jak proliferacja komórek w miejscu gojenia się ran, aż do takich, których odpowiedzią na czynnik wzrostu nerwów (NGF) jest zapobieganie śmierci określonych neuronów w rozwijającym się układzie nerwowym.

Białko Ras jest członkiem dużej rodziny małych, jednopolipeptydowych białek G wiążących GTP, często nazywanych monomerycznymi białkami wiążącymi GTP dla odróżnienia ich od trimerowych białek G, które omawialiśmy wcześniej w tym rozdziale. Białko Ras przypomina podjed-

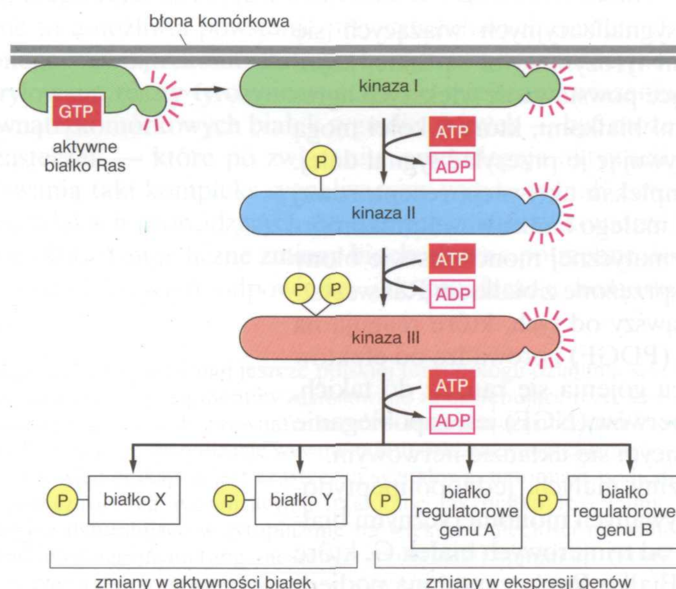


Rys. 15-29. Aktywacja białka Ras przez zaktywowaną receptorową kinazę tyrozynową. Do określonej ufosforylowanej reszty uaktywnionego receptora przyłączane jest białko adaptorowe (dla uproszczenia pominięto inne białka sygnalizacyjne, które na rys. 15-28 pokazano jako związane z receptorem). Białko adaptorowe wiąże i aktywuje inne białko, które działa jako aktywator białka Ras. To z kolei stymuluje białko Ras do wymienienia związanego z nim GDP na GTP. Następnie zaktywowane białko Ras stymuluje kolejny etap szlaku sygnalizacyjnego, przedstawiony na rys. 15-30

nostkę α białek G i podobnie działa jako przełącznik molekularny. Przełącza się ono cyklicznie między dwoma odmiennymi stanami konformacyjnymi — aktywnym, gdy jest związany z nim GTP, i nieaktywnym, gdy związany jest GDP (patrz. rys. 15-13B). W białku Ras wymiana jego GDP na GTP (a przez to przełączenie białka w stan aktywny) jest wymuszona przez interakcję białka Ras z białkiem aktywującym ten proces; po pewnym czasie opóźnienia białko Ras jest z powrotem wyłączane przez zhydrolizowanie jego GTP do GDP. Na rysunku 15-29 pokazano, jak dochodzi do sprzężenia zaktywowanej, receptorowej kinazy tyrozynowej z białkiem Ras poprzez krótką serię białek łączących, z których ostatnie jest właśnie białko aktywujące białko Ras.

W swym stanie aktywnym białko Ras inicjuje aktywację kaskady fosforylacyjnej, w której seria kinaz białkowych fosforyluje i aktywuje jedną kinazę po drugiej. Ten system przekaźników przenosi sygnał z błony komórkowej do jądra. Ostatnia kinaza białkowa kaskady fosforyluje określone białka regulatorowe genów, zmieniając ich zdolność do regulowania transkrypcji genów. Wynikiem jest zmiana układu, w jakim geny ulegają ekspresji (rys. 15-30). Zmiana taka może stymulować proliferację komórki, zapewniać przeżycie komórki lub kontrolować różnicowanie komórki: ostateczny rezultat będzie zależał od tego, jakie dalsze geny będą aktywne w komórce i jakie inne sygnały będą na nią działały.

Gdy białko Ras zostanie zahamowane przez wstrzyknięcie do komórki przeciwciał inaktywujących to białko, to po ekspozycji komórki na działa-



Rys. 15-30. Kaskada fosforylacyjna aktywowana przez białko Ras. Białko Ras, zaktywowane procesem pokazanym na rys. 15-29, uruchamia kaskadę fosforylacyjną trzech kinaz białkowych, które amplifikują i rozprowadzają sygnał. Ostatnia kinaza tej kaskady fosforyluje różne białka docelowe, kończące szlak sygnalizacyjny. Obejmują one inne kinazy białkowe oraz, co najważniejsze, białka regulatorowe genów kontrolujące ekspresję genów. Zmiany w ekspresji genów i aktywności białek powodują kompleksowe zmiany w zachowaniu się komórki, na przykład jej proliferację i różnicowanie, będące typowym końcowym wynikiem aktywacji szlaku sygnalizacyjnego Ras

nie czynnika wzrostu nie wystąpi odpowiedź, która normalnie powstałaby w tej komórce. Doświadczenia podobne do opisanego wykazały, że białko Ras jest istotnym składnikiem szlaku sygnalizacyjnego, wywołującego prawidłową odpowiedź komórki. Odwrotnie, gdy aktywność białka Ras jest włączona na stałe, co zdarza się w przypadku niektórych nadaktywnych form zmutowanego białka Ras, to komórka wykazuje taki sam efekt, jaki uzyskuje się przez ciągłą stymulację receptorowej kinazy tyrozynowej czynnikiem wzrostu. W rzeczywistości białko Ras odkryto właśnie w komórkach nowotworowych, w których mutacja genu kodującego Ras prowadziła do wytwarzania nadaktywnego białka Ras. To zmutowane białko Ras stymuluje komórki do podziałów nawet w nieobecności czynników wzrostu, a spowodowana tym nie kontrolowana proliferacja komórek jest istotnym czynnikiem powstawania nowotworu.

Około 30% nowotworów u ludzi ma mutacje w genach *ras*, a w wielu innych nowotworach występują mutacje genów, których produkty są składnikami tego samego szlaku sygnalizacyjnego, w którym działa Ras. Wiele genów kodujących te wewnątrzkomórkowe białka sygnalizacyjne zostało wykrytych podczas poszukiwania wywołujących nowotwory *onkogenów*, o których będzie mowa w rozdz. 18. Prawidłowe wersje genów kodujących normalne białka sygnalizacyjne są znane jako *protoonkogeny*, ponieważ mają one zdolność zamieniania się w drodze mutacji w onkogeny.

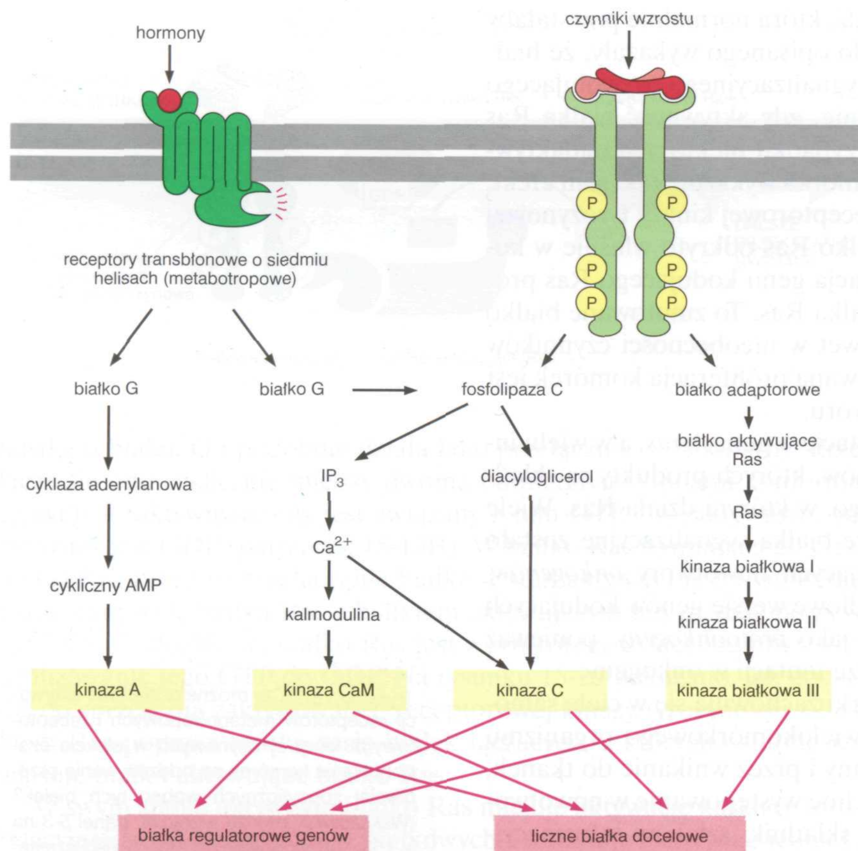
Nowotwór jest chorobą, w której komórki zachowują się w ciele samolubnie i aspołecznie, niszcząc harmonię wielokomórkowego organizmu przez proliferowanie, wtedy gdy nie powinny i przez wnikanie do tkanek, do których nie powinny wchodzić. Powszechne występowanie w nowotworach różnych mutacji genów kodujących składniki szlaków informacyjnych komórki jest ilustracją znanej prawdy, że utrzymanie stabilnej społeczności zależy w pierwszym rzędzie od dobrego przepływu informacji.

Pytanie 15-9. Czy można oczekiwać aktywacji receptorów metabotropowych i receptorowych kinaz tyrozynowych w efekcie eksponowania komórek na oddziaływanie przeciwciał specyficznych wobec tych białek? (Wskazówka: proszę przejrzeć panel 5-3 na s. 158–159, odnośnie do właściwości cząsteczek przeciwciał).

Sieć kinaz białkowych integruje informacje, co umożliwia kompleksową kontrolę zachowania się komórek

W rozdziale tym naszkicowaliśmy kolejno kilka głównych szlaków przekazywania sygnałów z powierzchni komórki do jej wnętrza. Na rysunku 15-31 porównano cztery szlaki, które omawialiśmy bardziej szczegółowo: drogi przebiegające 1) od receptorów metabotropowych poprzez białko G i dalej poprzez cykliczny AMP lub fosfolipazę C oraz 2) od receptorów katalitycznych poprzez fosfolipazę C lub poprzez białko Ras. Każdy szlak jest różny od innych, a jednak wszystkie one działają na zaskakująco podobnych zasadach. Różne szlaki używają pewnych wspólnych składników i wszystkie, aktywując w końcu kinazy białkowe, są w zasadzie zdolne do regulowania praktycznie każdego procesu w komórce.

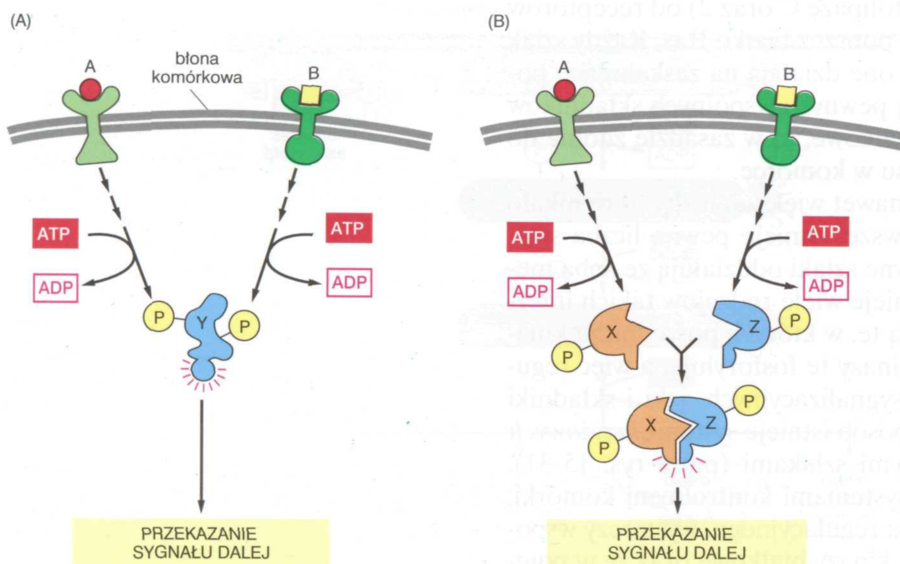
W rzeczywistości złożoność taka jest nawet większa, niżby to wynikało z dotychczasowego omówienia. Po pierwsze, istnieje pewna liczba szlaków, które pominęliśmy; po drugie, główne szlaki oddziałują ze sobą mechanizmami, których nie opisaliśmy. Istnieje wiele rodzajów takich interakcji, ale najbardziej rozległe skutki mają te, w których pośredniczą kinazy białkowe obecne w każdym szlaku. Kinazy te fosforylują, a więc regulują zarówno składniki innych szlaków sygnalizacyjnych, jaki i składniki szlaku, do którego same należą. W ten sposób istnieje system „*krzyżowych rozmów*" (ang. *cross-talk*) między różnymi szlakami (patrz rys. 15-31), a nawet między wszystkimi w zasadzie systemami kontrolnymi komórki. Aby wyrobić sobie pogląd o skali systemu regulacyjnego, wystarczy wspomnieć, że ok. 2% naszych genów koduje kinazy białkowe oraz że w poje-



Rys. 15-31. Cztery równoległe wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne i powiązania między nimi. W diagramie naszkicowano szlaki prowadzące od receptorów współpracujących z białkiem G (receptorów metabotropowych) poprzez cykliczny AMP i poprzez fosfolipazę C, a także prowadzące z receptorów katalitycznych (receptorowych kinaz tyrozynowych) poprzez fosfolipazę C poprzez białko Ras. W szlakach tych kinazy białkowe fosforylują wiele białek, łącznie z tymi, które wchodzą w skład innych szlaków. Powstającą gęstą sieć regulacyjnych powiązań przedstawiono symbolicznie *czerwonymi strzałkami* wychodzącymi z każdej z kinaz (na *tle żółtym*), które fosforylują niektóre z tych samych białek docelowych

dynczej komórce ssaków może istnieć ponad 1000 różnych typów kinaz białkowych. Jak zrozumieć sens tej zagmatwanej sieci powiązań kontrolnych i jaką ta złożoność ma funkcję?

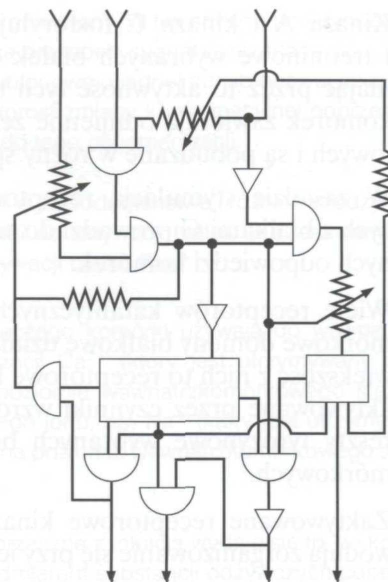
Komórki muszą łączyć informacje otrzymane z różnych źródeł i używać ich do wytworzenia stosownej odpowiedzi — żyć lub umrzeć, dzielić się, zmienić kształt, wydzielić produkt chemiczny i tak dalej. Przez krzyżowe rozmowy (cross-talk) pomiędzy szlakami informacyjnymi komórka potrafi złożyć razem dwa lub więcej bitów informacji i zareagować na tę



Rys. 15-32. Dwa możliwe mechanizmy integracji sygnałów. W (A) sygnały A i B aktywują różne kaskady fosforylacji białek, z których każda prowadzi do ufosforylowania białka Y, ale w różnych miejscach tego białka. Białko Y jest aktywowane jedynie wówczas, gdy zostaną ufosforylowane oba miejsca i dlatego będzie ono aktywne jedynie wówczas, gdy oba sygnały A i B wystąpią jednocześnie. W (B) sygnały A i B prowadzą do ufosforylowania dwóch białek, X i Z, które następnie łączą się ze sobą tworząc aktywne białko XZ

kombinację. Tak więc pewne białka wewnątrzkomórkowe mogą działać jako urządzenia integrujące, zazwyczaj przez to, że mają kilka potencjalnych miejsc fosforylacji, z których każde może zostać ufosforylowane przez różną kinazę białkową. Na takim białku można więc scalić informacje otrzymane z różnych źródeł i zamienić je w pojedynczy sygnał wyjściowy (rys. 15-32). Z kolei białka integrujące mogą dostarczać sygnał do wielu obiektów docelowych, mieszczących się w końcowych etapach szlaku sygnalizacyjnego. W ten sposób wewnątrzkomórkowy system sygnalizacyjny może działać jako sieć komórek nerwowych w mózgu, interpretując złożone informacje i tworząc kompleksowe odpowiedzi (rys. 15-33), tak jak dokonuje tego sieć mikroprocesorów w komputerze.

Obecny rozdział rozpoczęliśmy od rozważania sygnałów dochodzących do komórki z zewnątrz, ale zaprowadziło nas to daleko w głąb komórki, ujawniając działanie skomplikowanego systemu kontroli wewnątrzkomórkowej. Składniki tego systemu przenoszą wiadomości między różnymi częściami komórki, łączą i przetwarzają informacje z różnych źródeł, służą jako układy pamięciowe i decydują o chronologii wydarzeń. Ważnym celem takiego systemu kontroli jest cytoszkielet determinujący kształt komórki i odpowiedzialny za jej ruchy, o czym będzie mowa w następnym rozdziale.



Rys. 15-33. Sieć układów scalonych, na przykład w komputerze

Streszczenie

- Komórki w organizmie wielokomórkowym porozumiewają się za pomocą bardzo różnorodnych chemicznych sygnałów zewnątrzkomórkowych.
- Hormony są przenoszone z krwią do odległych komórek docelowych, natomiast większość innych zewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych działa tylko na krótkie odległości. Komórki sąsiadujące ze sobą często porozumiewają się przez bezpośredni kontakt powierzchni komórkowych.
- Sygnał zewnątrzkomórkowy pobudza komórki, gdy wiąże się on z białkiem receptora i aktywuje go. Każdy receptor rozpoznaje szczególną cząsteczkę sygnałową.
- Białkowe receptory działają jako przekaźniki przekształcając jedną fizyczną formę sygnału w drugą.
- Większość zewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych nie może przejść przez błonę komórkową; wiążą się one z receptorami błonowymi eksponowanymi na powierzchni komórki. Receptory te przenoszą sygnał na drugą stronę błony komórkowej.
- Małe hydrofobowe zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe, takie jak hormony steroidowe i tlenek azotu, mogą bezpośrednio dyfundować przez błonę komórkową; aktywują one wewnątrzkomórkowe białka receptorowe, które są albo regulatorowymi białkami genów, albo enzymami.
- Istnieją trzy główne klasy receptorów powierzchni komórki: 1) receptory jonotropowe — związane z kanałami jonowymi, 2) receptory metabotropowe — współpracujące z białkami G oraz 3) receptory katalityczne — związane z aktywnością enzymatyczną.
- Receptory metabotropowe i receptory katalityczne reagują na sygnały zewnątrzkomórkowe inicjacją kaskad wewnątrzkomórkowych reakcji sygnalizacyjnych, które zmieniają zachowanie się komórki.
- Receptory metabotropowe aktywują jedną z dwóch klas białek wiążących GTP, trimerowe białka G, które działają jako przełączniki molekularne, przenosząc przez krótki okres sygnał dalej do wnętrza komórki, a następnie wyłączają się przez zhydrolizowanie związanego z nimi GTP do GDP.
- Niektóre białka G bezpośrednio regulują kanały jonowe w błonie komórkowej. Inne aktywują enzym cyklazę adenylanową, zwiększając wewnątrzkomórkowe stężenie cyklicznego AMP. Jeszcze inne białka G aktywują enzym fosfolipazę C, która wytwarza wtórne cząsteczki informacyjne: trisfosforan inozytolu (IP_3) i diacyloglicerol.
- IP_3 otwiera kanały jonowe w błonie retikulum endoplazmatycznego, uruchamiając wypływ wolnych jonów Ca^{2+} do cytozolu. Ca^{2+} działa jako wewnątrzkomórkowa wtórna cząsteczka informacyjna, zmieniając aktywność szerokiego zestawu białek.
- Podwyższenie poziomu cyklicznego AMP aktywuje kinazę białkową A (kinazę A), natomiast Ca^{2+} łącznie z diacyloglicerolem aktywują kinazę białkową C (kinazę C).

- Kinaza A i kinaza C fosforylują reszty serynowe i treoninowe wybranych białek docelowych, zmieniając przez to aktywność tych białek. Różne typy komórek zawierają odmienne zestawy białek docelowych i są pobudzane w różny sposób.
- W zasadzie stymulacja receptorów współpracujących z białkami G prowadzi do szybkich i odwracalnych odpowiedzi komórek.
- Wiele receptorów katalitycznych ma wewnątrzkomórkowe domeny białkowe działające jako enzymy; większość z nich to receptorowe kinazy tyrozynowe, aktywowane przez czynniki wzrostu i fosforylujące reszty tyrozynowe wybranych białek wewnątrzkomórkowych.
- Zaktywowane receptorowe kinazy tyrozynowe powodują zorganizowanie się przy ich wewnątrzkomórkowych domenach wewnątrzkomórkowego kompleksu sygnalizacyjnego; funkcją części tego kompleksu jest aktywacja Ras, małego białka wiążącego GTP, które aktywuje kaskadę kinaz białkowych, przenoszących sygnał z błony komórkowej do jądra.
- Mutacje pobudzające proliferację komórek poprzez nadaktywację białka Ras są cechą wspólną dla wielu rodzajów nowotworów.
- Różne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne wchodzą ze sobą w interakcję, umożliwiając komórkom zareagowanie stosowną odpowiedzią na złożoną kombinację sygnałów. Pewne kombinacje sygnałów umożliwiają komórce przeżycie; inne kombinacje sygnałów zmuszą ją do proliferacji; gdy brak jakichkolwiek sygnałów, większość komórek popełni samobójstwo.

Hasła

adaptacja
białko G
białko Ras
cyklaza adenylanowa
cykliczny AMP
fosfolipaza C
hormon
hormon steroidowy
kalmodulina
kaskada sygnalizacyjna
kinaza A
kinaza C
kinaza CaM
mediator lokalny
nerwowy (neuronowy)
przekaźnik nerwowy
przekształcanie sygnału
przełącznik molekularny
przenoszenie sygnału
receptor (białko receptorowe)
receptor jonotropowy, związany z kanałem jonowym
receptor metabotropowy, współpracujący z białkiem G
receptorowa kinaza tyrozynowa
sygnalizacja komórkowa
tlenek azotu
wtórna cząsteczka informacyjna

Pytania

Pytanie 15-10. Które z następujących twierdzeń są prawdziwe? Wyjaśnij odpowiedzi.

A. Cząsteczka sygnałowa, acetylocholina, ma odmienny wpływ na różne typy komórek zwierzęcia i w różnych typach komórek wiąże się z różnymi receptorami.

B. Po wydzieleniu z komórek acetylocholina ma długi okres życia, ponieważ musi osiągnąć komórki docelowe w całym ciele.

C. Aktywatorami ciągu cząsteczek rozpoczynającego się od receptorów metabotropowych są zarówno podjednostki α zawierające związany GTP, jak i nie zawierające nukleotydów kompleksy $\beta\gamma$, ale nie jest aktywatorem całkowity kompleks białek G zwierający związany GDP.

D. IP_3 powstaje bezpośrednio z PIP_2, fosfatydyloinozytolu, bez wbudowywania dodatkowej grupy fosforanowej.

E. Kalmodulina reguluje wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+}.

F. Różne sygnały docierające do błony komórkowej mogą ulegać integracji za pomocą „cross-talk" między różnymi szlakami informacyjnymi wewnątrz komórki.

G. *Ras* jest onkogenem.

H. Fosforylowanie tyrozyny kreuje w receptorowych kinazach tyrozynowych miejsca wiążące dla innych białek.

Pytanie 15-11. Białko Ras działa jak przełącznik molekularny włączany przez inne białka, powodujące związanie z nim GTP. Przełącznik ten jest wyłączany przez białko aktywujące funkcję GTPazową, przez co Ras hydrolizuje związany z nim GTP do GDP o wiele szybciej, niż następowałoby to bez takiej aktywacji. Tak więc białko Ras działa jak przełącznik światła, który jedna osoba włącza, a druga wyłącza. Otrzymaliśmy zmutowaną komórkę, w której braknie białka aktywującego GTPazę; jakich nieprawidłowości można się spodziewać w sposobie reagowania aktywności białka Ras na sygnały zewnątrzkomórkowe?

Pytanie 15-12

A. Jakie są podobieństwa i różnice między sygnalizacją prowadzoną przez neurony a sygnalizacją polegającą na wydzielaniu hormonów przez komórki endokrynowe?

B. Omów i porównaj korzyści wynikające z tych dwóch mechanizmów.

Pytanie 15-13. Dwie wewnątrzkomórkowe cząsteczki, X i Y, są zwykle syntetyzowane ze stałą szybkością 1000 cząsteczek na sekundę na komórkę. Cząsteczka X jest rozkładana powoli i przeżywa przeciętnie 100 sekund. Cząsteczka Y jest rozkładana 10 razy szybciej, przeżywając przeciętnie 10 sekund.

A. Oblicz, ile cząsteczek X i Y zawiera komórka?

B. Gdyby szybkość syntezy zarówno X, jak i Y wzrosła gwałtownie 10-krotnie do 10000 cząsteczek na sekundę na komórkę — bez jakiejkolwiek zmiany w szybkości ich degradacji — to ile będzie cząsteczek X i Y po jednej sekundzie?

C. Która cząsteczka będzie się bardziej nadawała do szybkiej sygnalizacji?

Pytanie 15-14. „Dawno temu jeden z wielkich królów rządził ogromnym królestwem, które było najpiękniejsze na świecie. Każda roślina lśniła tak pięknie jak wyszlifowany diament, a faliste pagórki miały łagodność fal letniego morza. Mądrość wszystkich decyzji króla opierała się na stałym dopływie informacji dostarczanych mu codziennie przez posłańców, którzy opowiadali królowi wszystkie szczegóły dotyczące królestwa, tak iż mógł podejmować szybkie i odpowiednie decyzje. Jednak mimo wszechobecności piękna i efektywności, poddani czuli się straszliwie zagrożeni pod jego rządami, ponieważ król miał doradcę, który studiował przekazywanie sygnalizacji komórkowej i odpowiednio kierował królewskim ministerstwem informacji. Doradca wprowadził zasadę, że straż królewska ma wszystkim napotkanym informatorom natychmiast ścinać głowy, ponieważ w celu zapewnienia szybkiej informacji życie informatorów ma być krótkie. Ich błagania — nie zabijaj mnie, jestem tylko informatorem — były bezskuteczne i poddani szybko tracili swoich synów i córki." Dlaczego analogia, na której doradca króla opierał swą politykę, była niewłaściwa? Omów pokrótce te cechy, które odróżniają komórkowe szlaki sygnalizacyjne od sposobu przekazywania informacji u ludzi, opisanego w tej opowieści.

Pytanie 15-15. W serii doświadczeń wprowadzono do komórek geny kodujące zmutowane formy receptorowej kinazy tyrozynowej. W komórkach zachodzi również ekspresja normalnej formy receptora, zakodowanej w ich prawidłowym genie, aczkolwiek geny zmutowane zostały skonstruowane tak, aby ich ekspresja była silniejsza niż ekspresja genu prawidłowego. Jakie byłyby konsekwencje wprowadzenia zmutowanego genu, który kodowałby receptorową kinazę tyrozynową (A) pozbawioną domeny zewnątrzkomórkowej lub (B) pozbawioną domeny wewnątrzkomórkowej?

Pytanie 16-16. Omów następujące twierdzenie: „Białka błonowe o wielu helisach transbłonowych mogą po związaniu liganda ulegać zmianie konformacyjnej, która może być wykrywana po drugiej stronie błony. W ten sposób pojedyncze cząsteczki białka mogą przenosić sygnał przez błonę. Natomiast pojedyncze białka błonowe o jednej transbłonowej helisie nie mogą przenieść wprost zmiany konformacyjnej poprzez błonę, ale wymagają do tego oligomeryzacji."

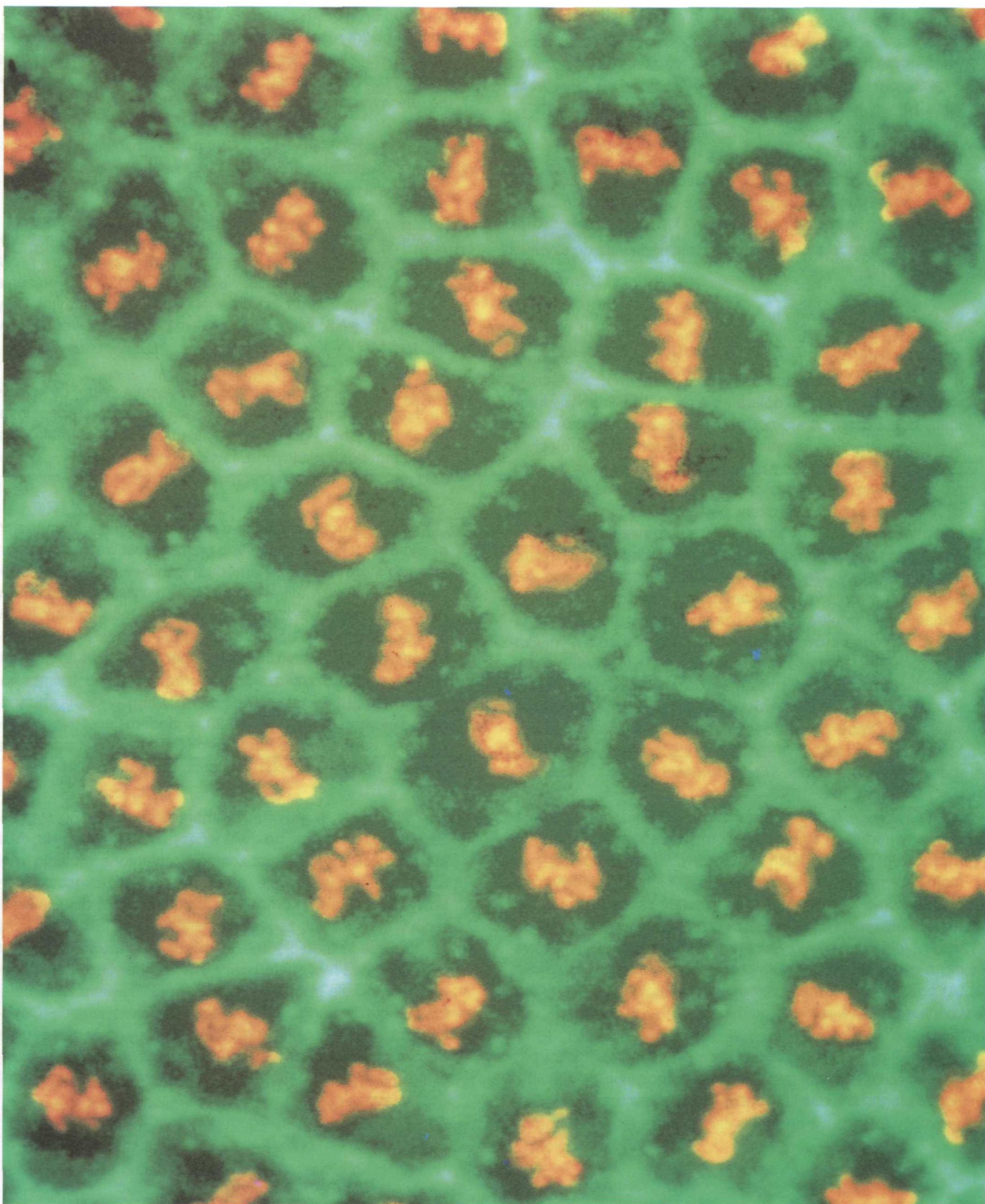
Pytanie 15-17. Jakie są podobieństwa i różnice między reakcjami prowadzącymi do aktywacji białek G a reakcjami prowadzącymi do aktywacji białka Ras?

Pytanie 15-18. Dlaczego komórki używają do wewnątrzkomórkowej sygnalizacji Ca^{2+} (który jest utrzymywany przez pompy Ca^{2+} na poziomie wewnątrzkomórkowego stężenia 10^{-7} M), a nie innego jonu, np. Na^{+} (który jest utrzymywany przez pompę Na^{+} na poziomie wewnątrzkomórkowego stężenia 10^{-3} M)?

Pytanie 15-19. Sprzeczne z intuicją wydaje się to, że komórka dysponując nadmiarem substancji odżywczych popełniłaby samobójstwo, gdyby nie była ustawicznie stymulowana sygnałami dochodzącymi z innych komórek (patrz rys. 15-6). Jaki może być cel takiej regulacji?

Pytanie 15-20. Skurcz układu miozyna/aktyna w komórkach mięśniowych jest uruchamiany przez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+}. Komórki mięśniowe mają wyspecjalizowane kanały uwalniające Ca^{2+} — nazywane receptorami rianodynowymi ze względu na ich wrażliwość na rianodynę, substancję farmakologicznie czynną — leżące w błonie retikulum sarkoplazmatycznego, wyspecjalizowanej formy retikulum endoplazmatycznego. W odróżnieniu od bramkowanych przez IP_3 kanałów Ca^{2+} w retikulum endoplazmatycznym, pokazanych na rys. 15-23, ligandem otwierającym receptory rianodynowe jest sam Ca^{2+}. Omów znaczenie kanałów rianodynowych dla skurczu komórki mięśniowej.

Pytanie 15-21. W wewnątrzkomórkowej kaskadzie sygnalizacyjnej działają kolejno dwie kinazy białkowe, K1 i K2. Jeśli którakolwiek z tych kinaz zostanie zmieniona mutacją znoszącą na stałe jej funkcję, odebrany sygnał zewnątrzkomórkowy nie wywoła w komórkach żadnej odpowiedzi. Inna mutacja w K1 sprawia, że jest on stale aktywny tak, iż komórka zawierająca tę mutację będzie reagować odpowiedzią nawet w nieobecności sygnału zewnątrzkomórkowego. Scharakteryzuj komórkę o podwójnej mutacji, która zawiera K2 z mutacją inaktywującą oraz K1 z mutacją stale aktywującą. Odpowiedź komórki obserwujemy nawet wtedy, gdy nie dociera do niej żaden sygnał. Czy więc w zwykłej drodze sygnalizacyjnej K1 aktywuje K2, czy też K2 aktywuje K1? Uzasadnij odpowiedź.



Wczesne podziały zapłodnionego jaja muszki owocowej *Drosophila* są synchroniczne i bardzo szybkie. Jądra dzielą się we wspólnej cytoplazmie, bez towarzyszących im podziałów komórkowych. Gdy powstanie ok. 6000 potomnych jąder, usadawiają się one pod powierzchnią jaja i dopiero wtedy zaczyna narastać do wnętrza błona plazmatyczna, otaczając każde jądro i tworząc odpowiadającą liczbę nowych komórek. Na tym obrazie, przedstawiającym powierzchnię jaja, chromosomy zabarwiono na *pomarańczowo*, a cytoszkielet aktynowy, związany z błonami tworzących się komórek, na *zielono*. (Dzięki uprzejmości: William Sullivan)

16

Cytoszkielet

FILAMENTY POŚREDNIE

- **Filamenty pośrednie są mocne i wytrzymałe**
- **Filamenty pośrednie zabezpieczają komórki przed stresem mechanicznym**

MIKROTUBULE

- **Mikrotubule są wydrążonymi rurkami z strukturalnie odmiennymi końcami**
- **Mikrotubule są utrzymywane dzięki równowadze między montażem a demontażem**
- **Centrosom jest głównym ośrodkiem organizującym mikrotubule w komórkach zwierzęcych**
- **Rosnące mikrotubule wykazują dynamiczną niestabilność**
- **Mikrotubule organizują wnętrze komórki**
- **Białka motoryczne kierują wewnątrzkomórkowym transportem**
- **Organelle są transportowane wzdłuż mikrotubul**
- **Rzęski i wici zawierają stabilne mikrotubule przemieszczane przez dyneinę**

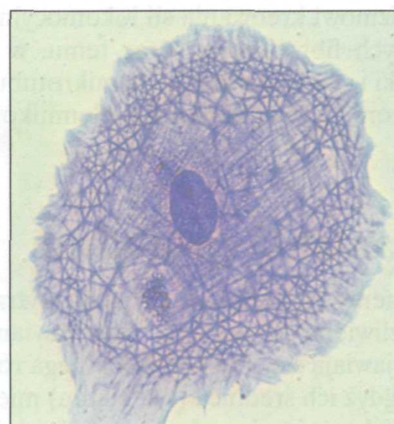
FILAMENTY AKTYNOWE

- **Filamenty aktynowe są cienkie i giętkie**
- **Aktyna i tubulina polimeryzują według podobnego mechanizmu**
- **Wiele białek wiąże się z aktyną i modyfikuje jej właściwości**
- **Bogata w aktynę kora komórki znajduje się pod błoną komórkową w większości komórek eukariotycznych**
- **Pełzanie komórki zależy od aktyny**
- **Aktyna łączy się z miozyną tworząc struktury kurczliwe**
- **Podczas skurczu mięśnia filamenty aktynowe wślizgują się między filamenty miozynowe**
- **Skurcz mięśnia jest wyzwalany przez nagły wzrost stężenia Ca^{2+}**

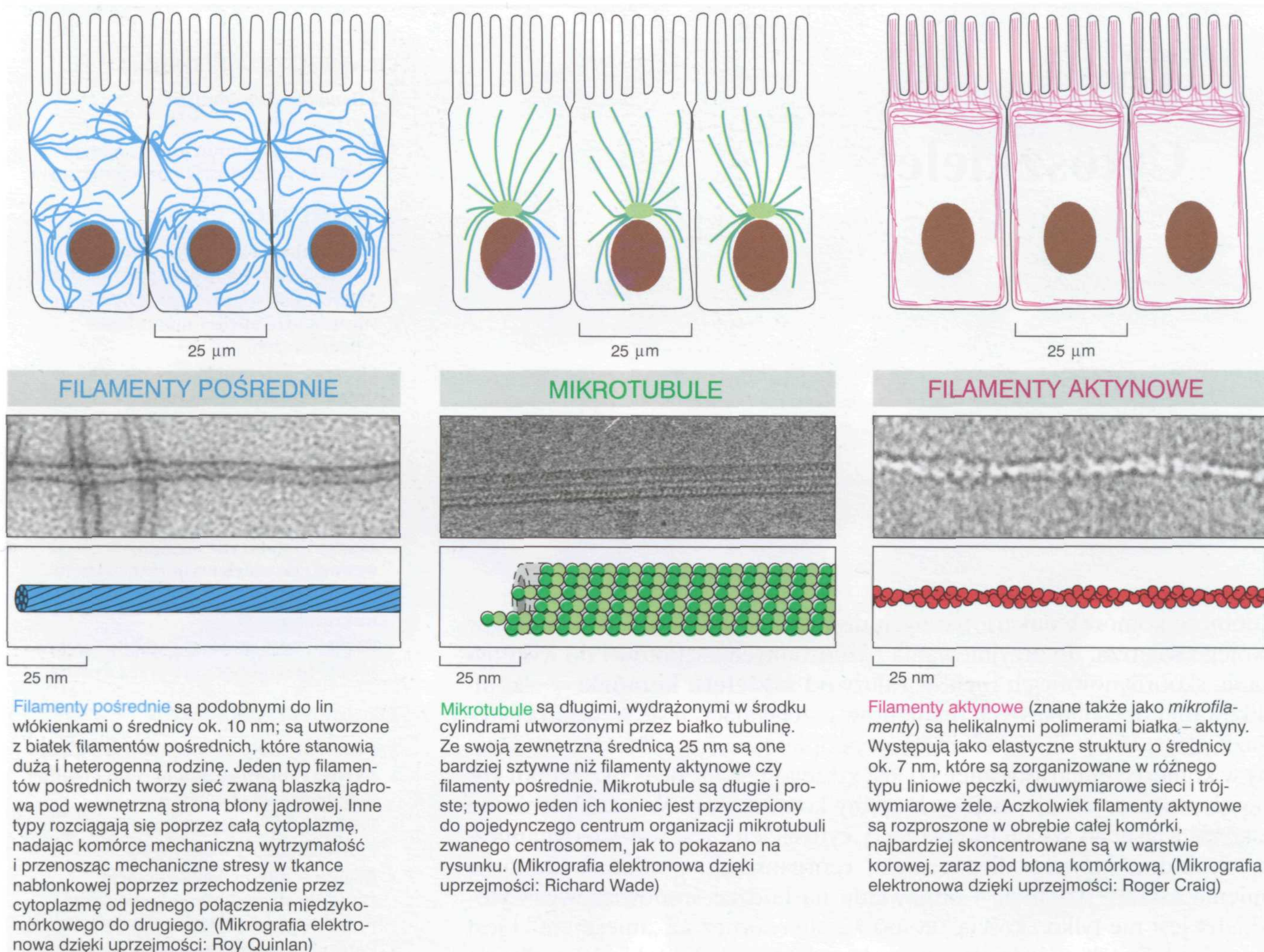
Zdolność komórek eukariotycznych do organizowania wielu składników swojego wnętrza, do przyjmowania różnorodnych kształtów i do wykonywania skoordynowanych ruchów zależy od **szkieletu komórki** — skomplikowanej sieci białkowych filamentów rozciągających się wewnątrz cytoplazmy (rys. 16-1). Ta sieć filamentów podpiera znaczną objętość cytoplazmy w komórce eukariotycznej, co jest szczególnie ważne w przypadku komórek zwierzęcych nie mających ściany komórkowej. W odróżnieniu od naszego własnego szkieletu kostnego, cytoszkielet jest wysoce dynamiczną strukturą, która podlega ciągłej reorganizacji, ponieważ komórka zmienia kształt, dzieli się i odpowiada na bodźce środowiskowe. Cytoszkielet jest nie tylko „kością" komórki, ale również jej „mięśniem" i jest bezpośrednio odpowiedzialny za ruchy na dużą skalę, takie jak pełzanie komórek po powierzchni, skurcze komórek mięśniowych i zmiany kształtu komórek, które występują w trakcie rozwoju embrionalnego.

Wnętrze komórki znajduje się także w ciągłym ruchu, a cytoszkielet stanowi „maszynerię" ruchów wewnątrzkomórkowych, takich jak transport organelli z jednego miejsca na drugie, separacja chromosomów do dwóch potomnych komórek w trakcie mitozy i rozdzielanie się komórek zwierzęcych w czasie podziałów. Wydaje się, że cytoszkielet jest wynalazkiem eukariotów, ponieważ jest nieobecny w komórkach prokariotycznych i mógł być przełomowym czynnikiem w ewolucji dużych i złożonych pod względem struktury komórek eukariotycznych. Komórka eukariotyczna, podobnie jak fabryka wytwarzająca złożony produkt, ma wysoce zorganizowane wnętrze, w którym wyspecjalizowane ośrodki są skoncentrowane w różnych regionach, ale połączone systemem transportowym. Cytoszkielet kontroluje zarówno przemieszczanie się organelli, jak również transport między nimi.

Cytoszkielet jest zbudowany z trzech rodzajów filamentów białkowych: *filamentów pośrednich*, *mikrotubul* i *filamentów aktynowych* (rys. 16-2). Każdy filament jest utworzony z różnych podjednostek białkowych. Rodzi-



Rys. 16-1. Cytoszkielet. Komórka skóry (fibroblast) w hodowli została utrwalona i zabarwiona błękitem Coomassiego, powszechnie używanym barwnikiem białek. Wewnątrz komórki rozciągają się różnorodne struktury filamentowe. Ciemny owal w centrum komórki to jądro komórkowe. (Dzięki uprzejmości: Colin Smith)



Filamenty pośrednie są podobnymi do lin włókienkami o średnicy ok. 10 nm; są utworzone z białek filamentów pośrednich, które stanowią dużą i heterogenną rodzinę. Jeden typ filamentów pośrednich tworzy sieć zwaną blaszką jądrową pod wewnętrzną stroną błony jądrowej. Inne typy rozciągają się poprzez całą cytoplazmę, nadając komórce mechaniczną wytrzymałość i przenosząc mechaniczne stresy w tkance nabłonkowej poprzez przechodzenie przez cytoplazmę od jednego połączenia międzykomórkowego do drugiego. (Mikrografia elektronowa dzięki uprzejmości: Roy Quinlan)

Mikrotubule są długimi, wydrążonymi w środku cylindrami utworzonymi przez białko tubulinę. Ze swoją zewnętrzną średnicą 25 nm są one bardziej sztywne niż filamenty aktynowe czy filamenty pośrednie. Mikrotubule są długie i proste; typowo jeden ich koniec jest przyczepiony do pojedynczego centrum organizacji mikrotubuli zwanego centrosomem, jak to pokazano na rysunku. (Mikrografia elektronowa dzięki uprzejmości: Richard Wade)

Filamenty aktynowe (znane także jako *mikrofilamenty*) są helikalnymi polimerami białka – aktyny. Występują jako elastyczne struktury o średnicy ok. 7 nm, które są zorganizowane w różnego typu liniowe pęczki, dwuwymiarowe sieci i trójwymiarowe żele. Aczkolwiek filamenty aktynowe są rozproszone w obrębie całej komórki, najbardziej skoncentrowane są w warstwie korowej, zaraz pod błoną komórkową. (Mikrografia elektronowa dzięki uprzejmości: Roger Craig)

Rys. 16-2. Trzy typy białkowych filamentów tworzących cytoszkielet. Pokazane komórki są komórkami nabłonka wyścielającego jelito

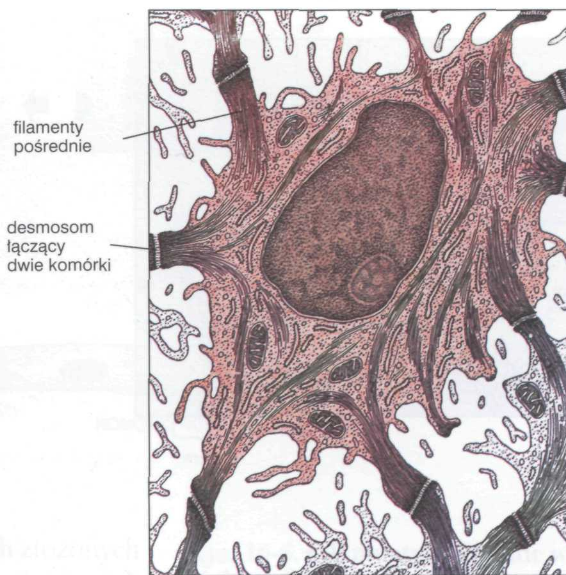
na białek włóknistych tworzy filamenty pośrednie, *tubulina* jest podjednostką mikrotubul, a *aktyna* stanowi podjednostkę filamentów aktynowych. W każdym przypadku tysiące podjednostek składają się na pozbawiony rozgałęzień białkowy sznur, który rozciąga się wzdłuż całej komórki.

W tym rozdziale rozważymy strukturę i funkcję sieci filamentów białkowych, zaczynając od filamentów pośrednich, które są obecne w komórkach o znacznej wytrzymałości mechanicznej. Przyjrzymy się także mechanizmowi kreowania sił lokomocyjnych przez szkielet aktynowy w pełzających fibroblastach oraz temu, w jaki sposób komórkowe wypustki (rzęski i witki) zbudowane z mikrotubul nadają ruch poruszającym się komórkom pierwotniaków lub plemnikom.

Filamenty pośrednie

Filamenty pośrednie mają dużą wytrzymałość i ich główną funkcją jest umożliwienie komórce przeciwstawiania się mechanicznym stresom, które pojawiają się, gdy komórka ulega rozciąganiu. Są nazywane „pośrednimi", gdyż ich średnica (ok. 10 nm) mieści się między średnicą filamentów cienkich zawierających aktynę a średnicą grubszych filamentów miozynowych komórek mięśni gładkich, gdzie wykryto je po raz pierwszy. Fila-





menty pośrednie są najbardziej sztywnymi i wytrzymałymi ze wszystkich trzech typów filamentów tworzących cytoszkielet; gdy komórki są poddawane działaniu stężonych roztworów soli i niejonowych detergentów, filamenty pośrednie pozostają, natomiast reszta cytoszkieletu komórki ulega zniszczeniu.

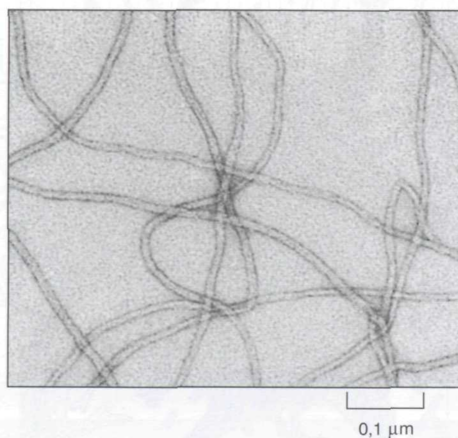
Filamenty pośrednie znajdują się w cytoplazmie większości, ale *nie* wszystkich komórek zwierzęcych. Zazwyczaj tworzą sieć wewnątrz cytoplazmy, otaczając jądro komórkowe i rozciągając się aż do krańców komórki. Są często zakotwiczone w błonie komórkowej w miejscach połączeń między komórkami, gdzie zewnętrzna powierzchnia błony styka się z błoną komórki sąsiedniej (rys. 16-3). Filamenty pośrednie są również wykrywane w obrębie jądra komórkowego, gdzie sieć utworzona przez filamenty pośrednie, zwana *blaszką jądrową* (ang. nuclear lamina), stanowi podstawę i wzmocnienie otoczki jądra we wszystkich komórkach eukariotycznych.

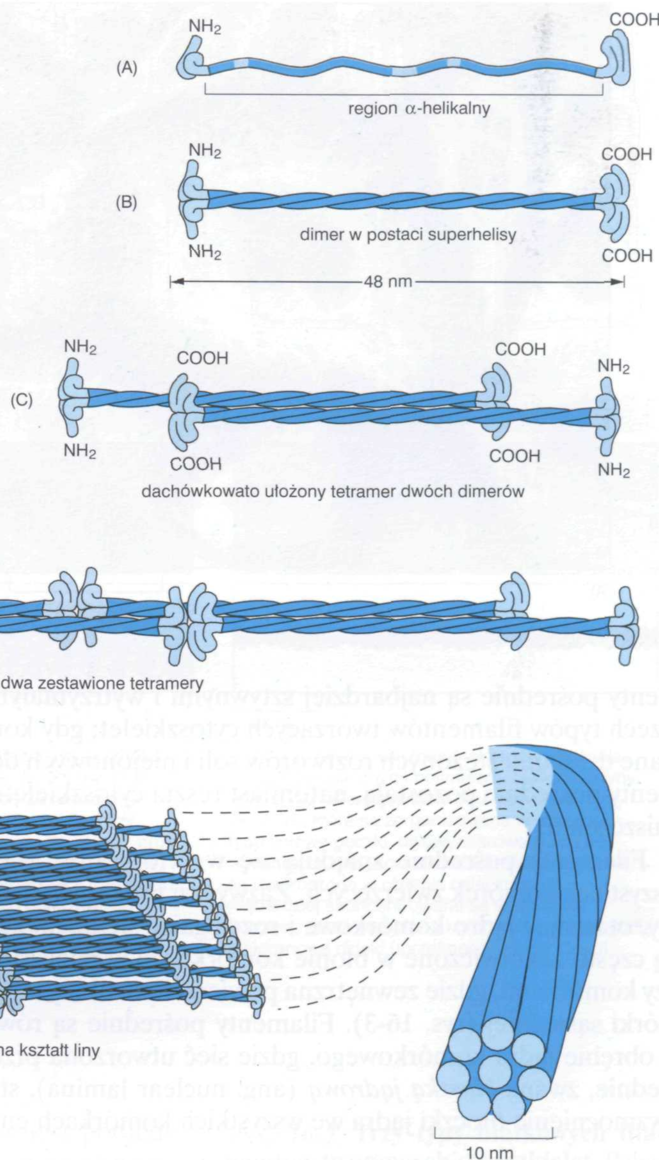
Rys. 16-3. Sieć filamentów pośrednich. (A) Immunofluorescencyjna mikrografia grupy hodowanych komórek naskórka wybarwionych tak, aby ukazać sieć filamentów pośrednich w ich cytoplazmie. Filamenty w każdej komórce są pośrednio związane z tymi, które znajdują się w sąsiadujących komórkach poprzez wyspecjalizowane połączenia komórkowe zwane desmosomami (omawianymi w rozdz. 19). (B) Rysunek oparty na mikrografii elektronowej skrawka naskórka, ukazujący pęczki filamentów pośrednich, które przechodzą poprzez całą cytoplazmę i wtapiają się w desmosomy. (A — dzięki uprzejmości: Michael Klimkowsky. B — z: R. V. Krstić, Ultrastructure of the Mammalian Cell: An Atlas. Berlin: Springer, 1979)

Filamenty pośrednie są mocne i wytrzymałe

Filamenty pośrednie przypominają linę składającą się z wielu długich nici skręconych razem w celu zwiększenia wytrzymałości na rozciąganie. Nici tej liny — podjednostki filamentów pośrednich — są wydłużonymi białkami włóknistymi, z których każde jest złożone z globularnej głowy na końcu aminowym, globularnego ogona na końcu karboksylowym oraz domeny środkowej wydłużonej na kształt pałeczki (rys. 16-4A). Ta ostatnia domena o charakterze α-helikalnym umożliwia parom białek filamentów pośrednich stworzyć stabilne dimery poprzez wzajemne owijanie się jeden wokół drugiego w tzw. konfigurację superhelisy (rys. 16-4B), jak to zostało opisane w rozdz. 5. Dwa takie dimery łączą się poprzez wiązanie niekowalencyjne, aby utworzyć tetramer (rys. 16-4C), a następnie tetramery wiążą się jeden z drugim, koniec do końca i bok do boku, również przez wiązanie niekowalencyjne, aby ostatecznie utworzyć podobny do liny filament pośredni (rys. 16-4D i E).

Centralne pałeczkowe domeny różnych białek tworzących filamenty pośrednie są podobne pod względem rozmiaru i sekwencji aminokwasów; stąd, kiedy upakowywują się razem, zawsze tworzą filamenty o podobnej



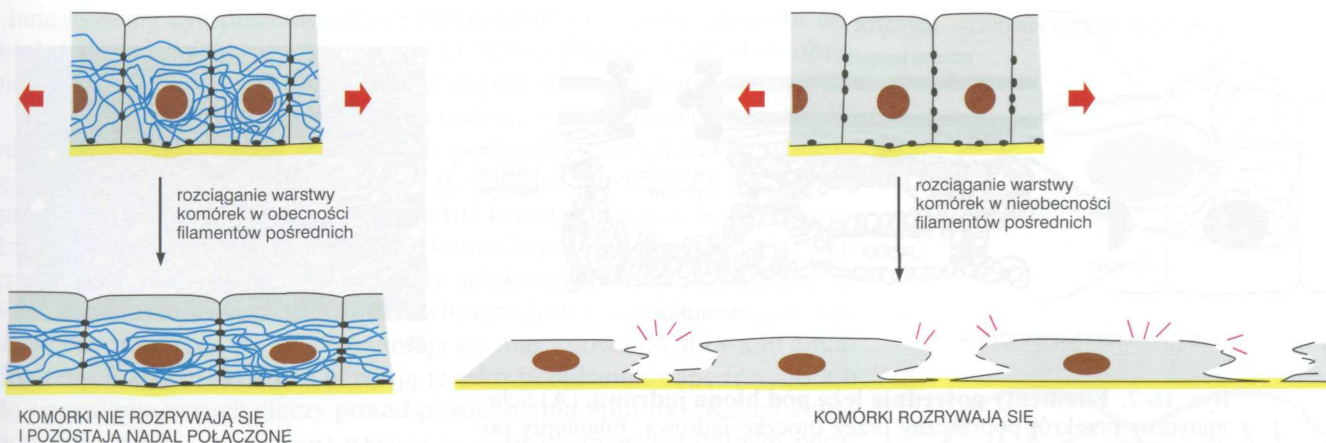


Rys. 16-4. Budowa filamentu pośredniego. Monomer białka filamentu pośredniego ukazany w (A) składa się z centralnej pałeczkowej domeny z globularnymi regionami na każdym końcu. Pary monomerów łączą się tworząc dimer (B), a dwa dimery zestawiają się następnie tworząc dachówkowato ułożony tetramer (C). Tetramery mogą upakowywać się razem koniec do końca, jak pokazano to w (D), i tworzyć układ helikalny (ukazany dla ułatwienia w formie spłaszczonej), który tworzy ostateczny linopodobny filament pośredni (E). Mikrografię ostatecznego filamentu o średnicy 10 nm pokazano w górnym lewym rogu. (Mikrografia elektronowa dzięki uprzejmości: Roy Quinlan)

średnicy i wewnętrznej strukturze. Natomiast zadaniem globularnych domen (głów i ogonów), które są eksponowane na powierzchni filamentu, jest przede wszystkim interakcja z innymi składnikami cytoplazmy. Domeny globularne różnią się znacznie zarówno wymiarem, jak i sekwencją aminokwasów poszczególnych białek filamentów.

Filamenty pośrednie zabezpieczają komórki przed stresem mechanicznym

Filamenty pośrednie dominują szczególnie w obrębie cytoplazmy komórek narażonych na stresy mechaniczne. Występują w dużej liczbie, np. wzdłuż aksonów komórek nerwowych, stanowiąc znaczące wzmocnienie dla tych ekstremalnie długich i delikatnych wypustek komórkowych. Są one również liczne w obrębie komórek mięśniowych i nabłonkowych, które są szczególnie narażone na mechaniczny stres, np. w skórze. W tych wszystkich komórkach filamenty pośrednie, poprzez napinanie się i rozkładanie efektu miejscowo przyłożonych sił, zapobiegają pękaniu komórek i ich błon w odpowiedzi na rozciąganie (rys. 16-5). Podobna reguła

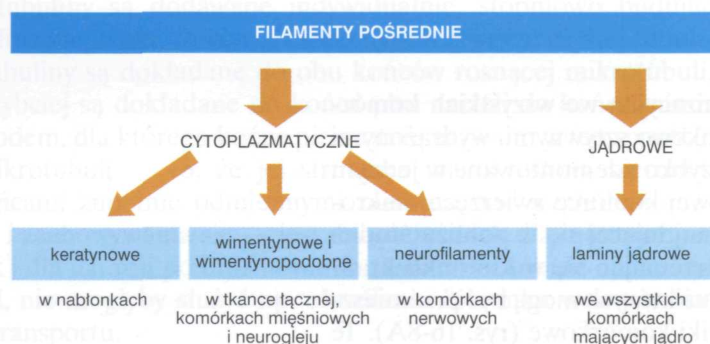


jest wykorzystywana do wyrobu wzmocnionego betonu i innych złożonych materiałów, w których linearne wytrzymałe na rozciąganie elementy, jak stalowe pręty, szklane lub węglowe włókna, są osadzone w ośrodku wypełniającym pozostałą przestrzeń.

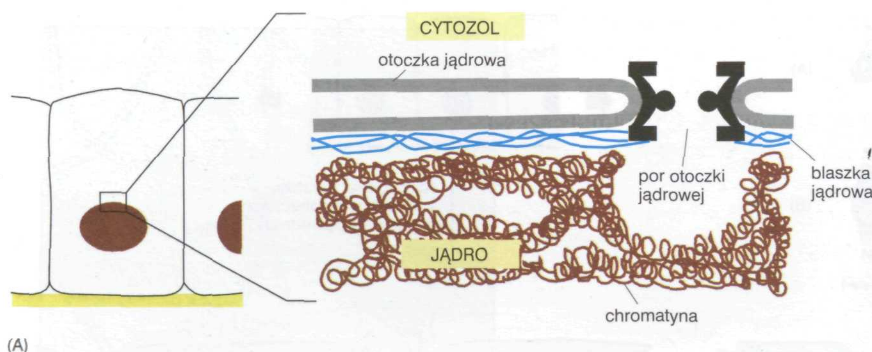
Rys. 16-5. Filamenty pośrednie wzmacniające komórkę zwierzęcą. Jeśli warstwa komórek nabłonkowych zostaje rozciągnięta z użyciem sił zewnętrznych (np. w związku ze wzrostem lub przemieszczaniem się okolicznych tkanek), to sieć filamentów pośrednich i połączeń desmosomowych, która rozciąga się wzdłuż warstwy komórek, wytwarza naprężenie i ogranicza stopień rozciągnięcia. Gdyby istniały tylko same połączenia komórkowe, to te same siły powodowałyby znaczną deformację komórek, nawet do takiego stopnia rozciągnięcia, które mogłoby spowodować pęknięcia błon komórkowych

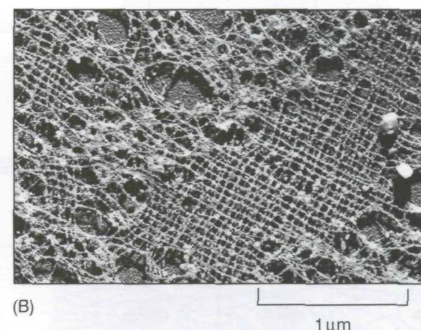
Filamenty pośrednie znajdujące się w cytoplazmie można podzielić na trzy klasy: 1) *filamenty keratynowe* w komórkach nabłonkowych; 2) *filamenty wimentynowe* i *filamenty wimentynopodobne* w komórkach tkanki łącznej i mięśni oraz w komórkach glejowych układu nerwowego; 3) *neurofilamenty* w komórkach nerwowych. Filamenty każdej klasy są utworzone przez polimeryzację odpowiednich białkowych podjednostek (rys. 16-6).

Najbardziej urozmaiconą rodzinę podjednostek stanowią *keratyny*. Na przykład, różne zestawy keratyn są znajdywane w różnych nabłonkach — inne w nabłonku wyścielającym jelito, a inne w naskórkowej warstwie skóry. Specjalne keratyny występują we włosach, piórach lub pazurach. W każdym przypadku keratynowe filamenty są utworzone z mieszaniny różnych keratynowych podjednostek. Filamenty keratynowe typowo spinają wewnątrz każdej komórki nabłonkowej poszczególne regiony błony komórkowej, a filamenty w przylegających do siebie komórkach nabłonkowych są pośrednio złączone poprzez połączenia komórka–komórka zwane *desmosomami* (patrz rys. 16-3), omówionymi w rozdz. 19. Końce filamentów keratynowych są przyczepione do desmosomów i łączą się z innymi składnikami komórki poprzez domeny swoich kulistych głów i ogonów, które wystają ponad powierzchnię utworzonego filamentu. Ta konstrukcja, uformowana z filamentów ułożonych równolegle do powierzchni nabłonka, jest bardzo wytrzymała na siły rozciągające skórę. Znaczenie tej funkcji jest widoczne w rzadkiej ludzkiej chorobie uwarunkowanej genetycznie *epidermolysis bullosa simplex* (zwykłe pęcherzowe oddzielanie się naskórka), w przypadku której mutacja w obrębie genu dla keratyny



Rys. 16-6. Główne rodzaje filamentów pośrednich





Rys. 16-7. Filamenty pośrednie leżą pod błoną jądrową. (A) *Schematyczny przekrój poprzeczny przez otoczkę jądrową. Filamenty pośrednie blaszki jądrowej leżą po jądrowej stronie wewnętrznej warstwy otoczki jądrowej; uważa się, że stanowią one miejsca przyczepu dla chromatyny zawierającej DNA.* (B) Mikrografia elektronowa fragmentu blaszki jądrowej oocytu żaby. Blaszka jest utworzona z kratki filamentów pośrednich złożonych z białek lamin. (Blaszka jądrowa innych typów komórek nie zawsze jest zorganizowana tak regularnie, jak to tutaj ukazano). (B dzięki uprzejmości: Ueli Aebi)

jest odpowiedzialna za nieprawidłowe formowanie filamentów keratynowych naskórka. W rezultacie skóra jest bardzo podatna na mechaniczne uszkodzenie i nawet delikatny ucisk może zniszczyć jej komórki powodując powstawanie pęcherzy skórnych.

Gdy cytoplazmatyczne filamenty pośrednie przypominają liny, to pośrednie filamenty wyścielające i wzmacniające wewnętrzną powierzchnię błony jądrowej są zorganizowane w dwuwymiarową sieć (rys. 16-7). Filamenty pośrednie w obrębie mocnej **blaszki jądrowej** są zbudowane z białek zwanych *laminami* (nie mylić z *lamininą*, która jest białkiem substancji międzykomórkowej). W odróżnieniu od bardzo stabilnych cytoplazmatycznych filamentów pośrednich znajdowanych w wielu komórkach, filamenty pośrednie blaszki jądrowej ulegają demontażowi i formowaniu na nowo przy każdym podziale komórkowym, gdy otoczka jądra rozpada się podczas mitozy i następnie tworzy się na nowo w każdej komórce potomnej.

Demontaż i ponowne formowanie blaszki jądrowej jest kontrolowane przez fosforylację i defosforylację (omawianą w rozdz. 5) lamin przez kinazy białkowe. Następująca w wyniku ufosforylowania zmiana konformacji lamin osłabia wiązania między tetramerami i powoduje, że filamenty ulegają rozpadowi. Defosforylacja następująca na końcu mitozy powoduje ponowne łączenie się lamin (patrz rys. 17-14).

Pytanie 16-1. W których z następujących typów komórek oczekiwałbyś dużej zawartości filamentów pośrednich w cytoplazmie? Wyjaśnij odpowiedź.

A. *Amoeba proteus* (wolno żyjąca ameba).
B. Komórka nabłonka skóry.
C. Komórka mięśnia gładkiego przewodu pokarmowego.
D. *Escherichia coli*.
E. Komórka nerwowa w rdzeniu kręgowym.
F. Komórka plemnika.
G. Komórka roślinna.

Mikrotubule

Mikrotubule mają decydującą rolę organizacyjną we wszystkich komórkach eukariotycznych. Są długimi i stosunkowo sztywnymi, wydrążonymi rurkami białkowymi, które mogą zostać szybko zdemontowane w jednym miejscu, a uformowane w innym. W typowej komórce zwierzęcej mikrotubule wyrastają z niewielkiej struktury znajdującej się w pobliżu środka komórki zwanej *centrosomem*. Rozprzestrzeniając się w kierunku krańców komórki tworzą system szlaków, wzdłuż których mogą być przemieszczane pęcherzyki, organelle i inne składniki komórkowe (rys. 16-8A). Te

i inne systemy cytoplazmatycznych mikrotubul są częścią szkieletu komórki odpowiedzialnego głównie za określanie pozycji organelli w obrębie komórki oraz za ukierunkowany transport wewnątrzkomórkowy.

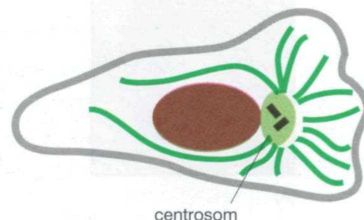
Kiedy komórka wchodzi w stadium mitozy, cytoplazmatyczne mikrotubule ulegają demontażowi, a następnie ponownie formują zawiłą strukturę zwaną *wrzecionem mitotycznym*. Jak opisano w rozdz. 17, wrzeciono mitotyczne stanowi maszynerię, która tuż przed podziałem komórki rozdziela chromosomy równo dla każdej komórki potomnej (rys. 16-8B). Mikrotubule mogą również tworzyć stałe struktury, których przykładem są wykonujące rytmiczne ruchy bijące włosopodobne struktury zwane *rzęskami* i *wiciami* (rys. 16-8C). Wyłaniają się one z powierzchni wielu eukariotycznych komórek, które używają je jako urządzenia napędowego lub do wprawiania w ruch cieczy ponad powierzchnią komórki. Rdzeń eukariotycznej rzęski czy wici jest wysoce zorganizowanym i stabilnym pęczkiem mikrotubul. (Wić u bakterii ma zupełnie odmienną strukturę i służy jako urządzenie napędowe na innej zasadzie).

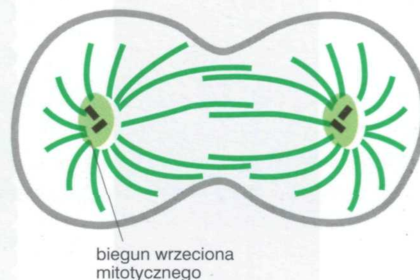
W tej części rozdziału najpierw przyjrzymy się strukturze i formowaniu mikrotubul, a następnie przedyskutujemy ich rolę w organizacji cytoplazmy. Ich funkcja organizacyjna zależy od współpracy mikrotubul z białkami dodatkowymi, szczególnie *białkami motorycznymi*, które przemieszczają organelle wzdłuż cytoszkieletowych szlaków. Na zakończenie omówimy strukturę i funkcję rzęsek i wici, w których mikrotubule są na stałe połączone z białkami motorycznymi, umożliwiając bijące ruchy tych wypustek komórkowych.

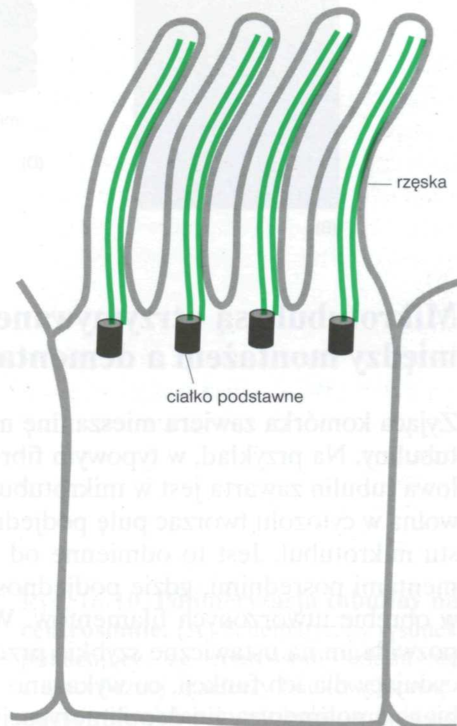
Mikrotubule są wydrążonymi rurkami ze strukturalnie odmiennymi końcami

Mikrotubule są utworzone przez podjednostki — cząsteczki **tubuliny** — z których każda jest dimerem złożonym z dwóch bardzo podobnych białek globularnych zwanych *α-tubuliną* i *β-tubuliną*, powiązanych razem wiązaniami niekowalencyjnymi. Podjednostki tubuliny łączą się ze sobą również przez wiązanie niekowalencyjne, tworząc ścianę wydrążonej cylindrycznej mikrotubuli. Całość tworzy cylinder zbudowany z 13 równoległych *protofilamentów*, z których każdy jest linearnym łańcuchem podjednostek tubulinowych z α- i β-tubuliną, występującymi na przemian wzdłuż całego łańcucha (rys. 16-9). Każdy protofilament ma strukturalną biegunowość polegającą na tym, że α-tubulina jest eksponowana na jednym, a β-tubulina na drugim końcu. To spolaryzowanie, stanowiące rodzaj strzałki kierunkowej zawartej w strukturze, jest takie samo dla wszystkich protofilamentów, nadając strukturalną biegunowość mikrotubuli jako całości. Jeden koniec mikrotubuli, określony jako koniec β-tubulinowy, jest nazywany *końcem plus*, a koniec α-tubulinowy — *końcem minus*.

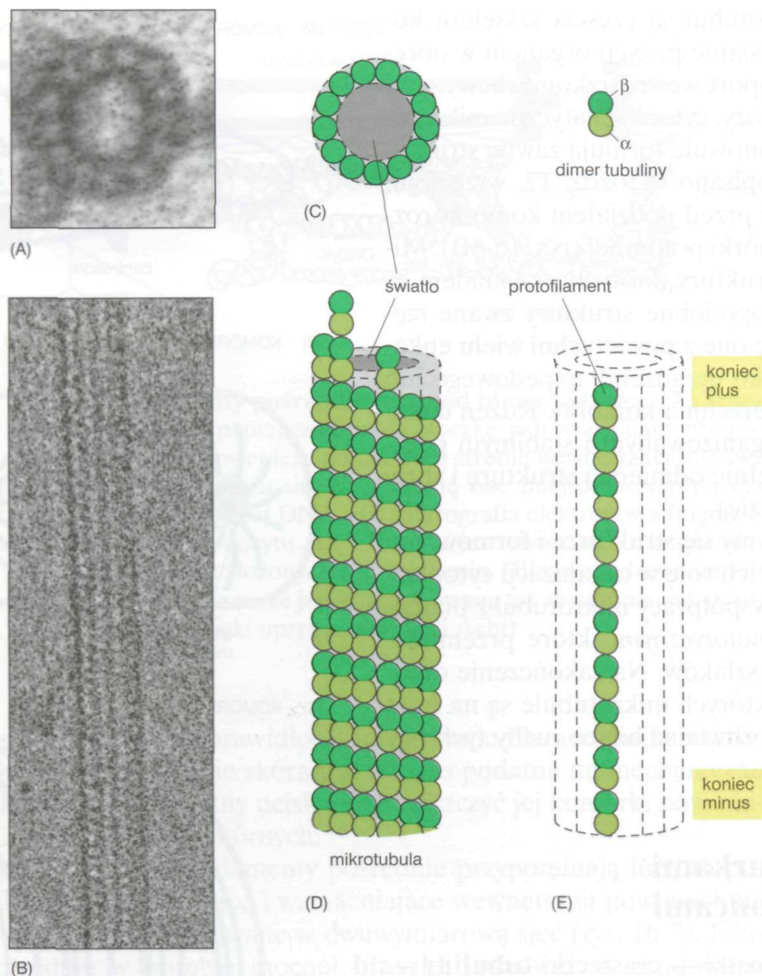
Mikrotubule powstają z inicjującego pierścienia 13 cząsteczek tubuliny. Dimery tubuliny są dodawane indywidualnie, stopniowo budując strukturę wydrążonej rurki. *In vitro*, w stężonym roztworze czystej tubuliny, dimery tubuliny są dokładane do obu końców rosnącej mikrotubuli, jakkolwiek szybciej są dokładane do końca plus aniżeli do końca minus (co było powodem, dla którego końce pierwotnie nazwano w ten sposób). Polarność mikrotubuli — to, że jej struktura ma określony kierunek z dwoma końcami zupełnie odmiennymi zarówno pod względem chemicznym, jak i zachowywania się — jest decydująca tak dla montażu mikrotubuli, jak i dla ich roli po uformowaniu. Jeśli mikrotubule nie miałyby polarności, nie mogłyby służyć np. określaniu kierunku wewnątrzkomórkowego transportu.







Rys. 16-8. Trzy umiejscowienia mikrotubul w komórkach eukariotycznych. W odróżnieniu od filamentów pośrednich, mikrotubule (kolor *ciemnozielony*) zazwyczaj wyrastają z ośrodków organizacji takich jak (A) centrosom, (B) bieguny wrzeciona czy (C) ciałko podstawne rzęski



Rys. 16-9. *Struktura mikrotubuli.* (A) Przekrój poprzeczny mikrotubuli z pierścieniem 13 wyraźnych podjednostek, z których każda odpowiada pojedynczemu dimerowi tubuliny. (B) Podłużny obraz mikrotubuli oglądanej w mikroskopie elektronowym. (C i D) Schemat ukazujący, jak cząsteczki tubuliny upakowują się w ścianie mikrotubuli. (C) 13 cząsteczek w przekroju poprzecznym. (D) Widok z boku na krótki odcinek mikrotubuli z cząsteczkami tubuliny ułożonymi w rzędy, czyli protofilamenty. (E) Jedna cząsteczka tubuliny (dimer αβ) i jeden protofilament ukazane schematycznie, łącznie z ich umiejscowieniem w ścianie mikrotubuli. Zauważ, że wszystkie cząsteczki tubuliny są zorganizowane w protofilamenty o tej samej orientacji, stąd mikrotubula ma określoną strukturalną polarność. (Dzięki uprzejmości: A — Richard Linck; B — Richard Wade)

Mikrotubule są utrzymywane dzięki równowadze między montażem a demontażem

Żyjąca komórka zawiera mieszaninę mikrotubul i wolnych podjednostek tubuliny. Na przykład, w typowym fibroblaście w każdej chwili blisko połowa tubulin zawarta jest w mikrotubulach, podczas gdy reszta pozostaje wolna w cytozolu tworząc pulę podjednostek wykorzystywanych do wzrostu mikrotubul. Jest to odmienne od sytuacji z bardziej stabilnymi filamentami pośrednimi, gdzie podjednostki znajdują się prawie całkowicie w obrębie utworzonych filamentów. Względna niestabilność mikrotubul pozwala im na ustawiczne szybkie przemodelowywanie i ten fakt jest decydujący dla ich funkcji, co wykazano poprzez wpływ leków, które zapobiegają polimeryzacji i depolimeryzacji tubuliny.

Zastanówmy się nad wrzecionem mitotycznym, stanowiącym rusztowanie z mikrotubul, które ukierunkowuje chromosomy podczas mitozy (patrz rys. 16-8B). Jeśli komórka będąca w trakcie mitozy jest poddana działaniu leku *kolchicyny*, który wiąże się ściśle z wolnymi cząsteczkami tubuliny i zapobiega ich polimeryzacji w mikrotubule, wrzeciono mitotyczne szybko zanika i komórka zatrzymuje się w środku mitozy, niezdolna do rozdziału swoich chromosomów na dwie grupy. To wskazuje, że wrzeciono mitotyczne jest utrzymywane poprzez stałą równowagę między wiązaniem i uwalnianiem podjednostek tubulinowych. Kiedy wiązanie tubulin zostaje zablokowane przez kolchicynę, uwalnianie tubulin trwa aż do zaniku wrzeciona.

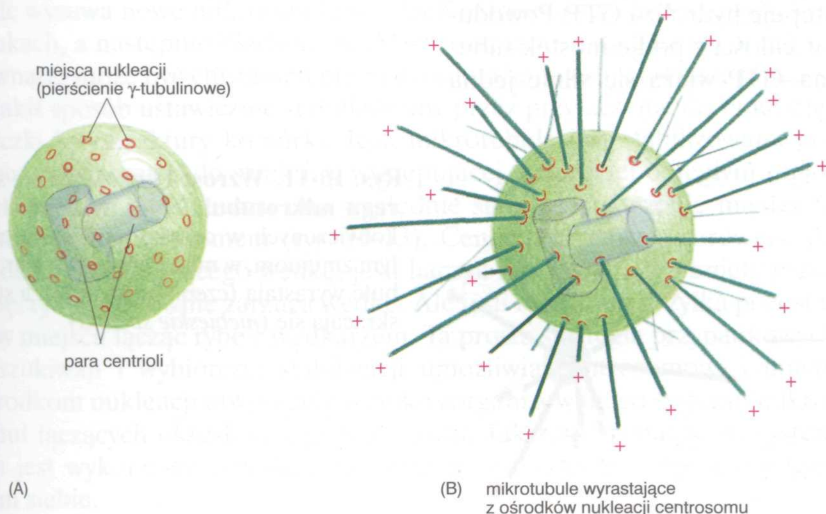
Lek o nazwie *taksol* wykazuje odwrotne działanie na poziomie molekularnym. Wiąże się on ściśle z mikrotubulami i zapobiega uwalnianiu podjednostek tubulinowych. W tym czasie nowe podjednostki będą ciągle wiązane, co powoduje, że mikrotubule mogą rosnąć, ale nie są w stanie się skracać. Jednak, wbrew tym różnicom w działaniu molekularnym, taksol ma ten sam ostateczny wpływ na komórkę jak kolchicyna — zatrzymuje dzielącą się komórkę w stadium mitozy. Pokazuje nam to, że do pełnej funkcji wrzeciona mikrotubule muszą być zdolne zarówno do montażu, jak i demontażu. Zachowanie się wrzeciona jest omawiane bardziej szczegółowo w rozdz. 17, kiedy opisujemy mitozę.

Inaktywacja lub destrukcja wrzeciona mitotycznego ostatecznie zabija dzielącą się komórkę. Komórki nowotworowe, które dzielą się znacznie szybciej niż większość innych komórek organizmu, mogą być więc uśmiercone wybiórczo przez *leki antymitotyczne* stabilizujące lub destabilizujące mikrotubule. Takie leki, wywodzące się z kolchicyny i taksolu, są używane w terapii klinicznej nowotworów.

Centrosom jest głównym ośrodkiem organizującym mikrotubule w komórkach zwierzęcych

Mikrotubule w komórkach tworzą się w wyniku wyrastania z wyspecjalizowanych ośrodków, które kontrolują ich liczbę, umiejscowienie i orientację w cytoplazmie. Na przykład, w komórkach zwierzęcych **centrosom**, który jest typowo obecny po jednej stronie jądra komórkowego, kiedy komórka nie jest w stadium mitozy, organizuje mikrotubule w układ promieniujący, od jądra poprzez cytoplazmę (patrz rys. 16-8A). Centrosomy zawierają setki struktur o kształcie pierścienia utworzonych przez inny typ tubuliny, γ-tubulinę, a każdy γ-tubulinowy pierścień służy jako punkt startowy lub *miejsce nukleacji* do wzrostu jednej mikrotubuli (rys. 16-10A). Dimery αβ-tubuliny dołączają się do γ-tubulinowego pierścienia w specyficznym kierunku, czego rezultatem jest to, że koniec minus każdej mikrotubuli jest osadzony w centrosomie, a wzrost następuje tylko od strony końca plus, tj. końca skierowanego na zewnątrz (rys. 16-10B).

Pierścieni γ-tubulinowych w centrosomie nie należy mylić z **centriolami**, osobliwymi strukturami, z których każda jest utworzona przez cylindryczny układ krótkich mikrotubul osadzonych w centrosomach większo-



Rys. 16-10. Polimeryzacja tubuliny na centrosomie. (A) Schematyczny rysunek pokazujący, że centrosom składa się z amorficznej macierzy białkowej zawierającej pierścienie γ-tubulinowe, które stanowią ośrodki wzrostu mikrotubul. W komórkach zwierzęcych centrosom zawiera parę centrioli, z których każda jest zbudowana z cylindrycznego układu krótkich mikrotubul. (B) Centrosom z wyrastającymi mikrotubulami. Koniec minus każdej mikrotubuli jest zatopiony w centrosomie, wyrastając z pierścieniowego miejsca nukleacji, natomiast koniec plus każdej mikrotubuli pozostaje swobodny w cytoplazmie

ści komórek zwierzęcych. Centriole nie mają znaczenia w nukleacji mikrotubul w obrębie centrosomu (do czego wystarczają same pierścienie γ-tubulinowe), a ich funkcja w tym regionie pozostaje nieznana, szczególnie że komórki roślinne ich nie mają. Centriole są jednakże podobne, jeśli nie identyczne, do *ciałek podstawnych*, które tworzą ośrodki organizacji mikrotubul w rzęskach i wiciach (patrz rys. 16-8C), jak to zobaczymy później w tym rozdziale.

Mikrotubule wymagają ośrodków nukleacji, takich jak te utworzone przez pierścienie γ-tubulinowe w centrosomie, ponieważ znacznie trudniej jest zacząć nową mikrotubulę przez złożenie pierwszego pierścienia z dimerów αβ-tubuliny, niż dodać te dimery do istniejącej już wcześniej struktury mikrotubuli. Oczyszczona, wolna αβ-tubulina może polimeryzować spontanicznie *in vitro*, kiedy występuje w dużym stężeniu, ale w obrębie żywej komórki stężenie wolnej αβ-tubuliny jest zbyt małe, aby zacząć pierwszy, trudny etap montowania inicjującego pierścienia nowej mikrotubuli. Poprzez utrzymywanie ośrodków organizacyjnych zawierających miejsca nukleacji i utrzymywanie małego stężenia podjednostek wolnej αβ-tubuliny komórki mogą kontrolować miejsca powstawania mikrotubul.

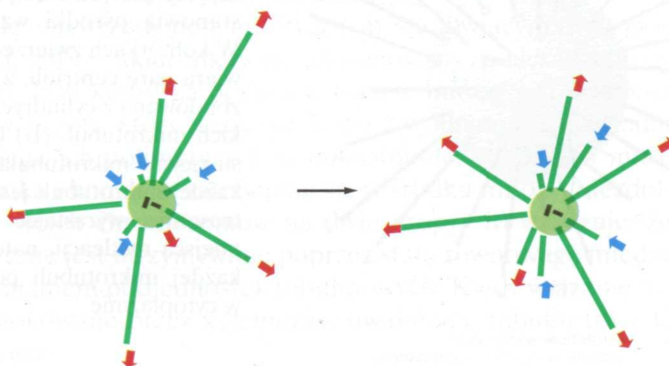
Pytanie 16-2. Jak myślisz, dlaczego jest znacznie łatwiej przyłączać tubulinę do istniejącej mikrotubuli, niż zaczynać nową mikrotubulę od początku? Wyjaśnij, w jaki sposób γ-tubulina w centrosomie pomaga pokonać tę przeszkodę.

Rosnące mikrotubule wykazują dynamiczną niestabilność

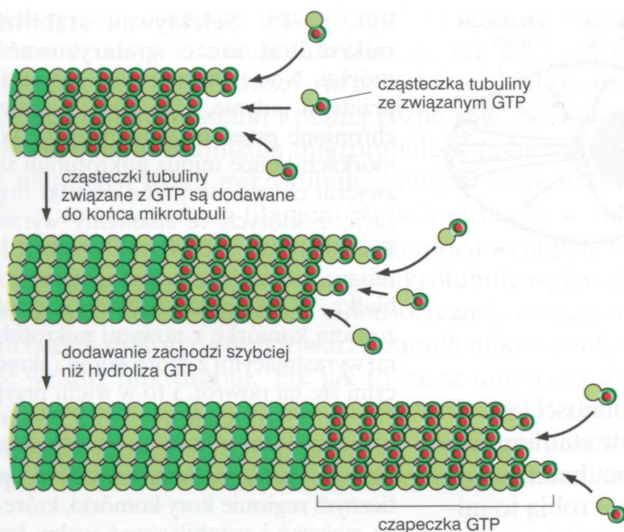
Jeśli mikrotubula ulega nukleacji, jej koniec plus narasta typowo na zewnątrz od ośrodka organizacji przez wiele minut poprzez dodawanie podjednostek. Następnie, nieoczekiwanie, mikrotubula nagle przechodzi zmianę, która powoduje, że skraca się gwałtownie ku swojej podstawie, a to poprzez utratę podjednostek z wolnego końca. Może zmniejszyć się częściowo, a następnie, często również nagle, zacząć rosnąć od nowa lub też może zniknąć zupełnie i być zastąpiona przez nową mikrotubulę wyrastającą z tego samego pierścienia γ-tubulinowego (rys. 16-11).

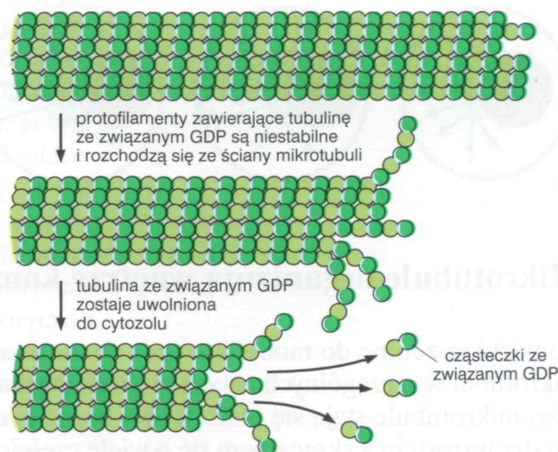
To szczególne zachowanie, znane jako **dynamiczna niestabilność**, wywodzi się z wewnętrznej zdolności cząsteczek tubuliny do hydrolizowania GTP. Każdy wolny dimer tubulinowy zawiera jedną ściśle związaną cząsteczkę GTP, która jest hydrolizowana do GDP (nadal ściśle związanego) zaraz potem, gdy podjednostka zostanie dodana do rosnącej mikrotubuli. Połączone z GTP cząsteczki tubulinowe są upakowywane skutecznie w ścianie mikrotubuli, natomiast cząsteczki tubuliny niosące GDP mają inną konformację i wiążą się ze sobą słabiej.

Jeśli polimeryzacja postępuje szybko, cząsteczki tubuliny są dodawane do końca mikrotubuli szybciej, aniżeli następuje hydroliza GTP. Powoduje to, że mikrotubula jest złożona prawie w całości z podjednostek tubulina–GTP. Ponieważ podjednostki tubulina–GTP wiążą się silnie jedna



Rys. 16-11. Wzrost i kurczenie się szeregu mikrotubul. Zbiór mikrotubul zakotwiczonych w centrosomie ulega ciągłym zmianom, w miarę jak nowe mikrotubule wyrastają (*czerwone strzałki*), a stare skracają się (*niebieskie strzałki*)





Rys. 16-12. Jak hydroliza GTP może kontrolować wzrost mikrotubul. Dimery tubuliny zawierające GTP (kolor *czerwony*) wiążą się ze sobą znacznie ściślej, niż dimery tubuliny zawierające GDP (kolor *ciemnozielony*). Stąd mikrotubule, które mają świeżo przyłączone dimery tubuliny ze związanym GTP (tzw. czapeczką GTP) wykazują tendencję do kontynuowania wzrostu. Niemniej jednak od czasu do czasu, szczególnie jeśli wzrost mikrotubuli jest powolny, podjednostki w tej „czapeczce GTP" będą hydrolizowały swój GTP do GDP, zanim nowa podjednostka z GTP zostanie przyłączona. Tym sposobem następuje utrata czapeczki GTP; podjednostki zawierające GDP są znacznie mniej ściśle związane z polimerem i są łatwiej uwalniane z jego wolnego końca, tak że mikrotubula zaczyna się skracać

z drugą, tworzą na końcu mikrotubuli rodzaj „czapeczki" — zwanej *GTP cap* — która zapobiega depolimeryzacji. W tej sytuacji mikrotubula będzie kontynuować wzrost, ponieważ depolimeryzacja może zachodzić tylko w wyniku uwalniania podjednostek na wolnym końcu. Jednakże z powodu przypadkowości procesów chemicznych może się czasami zdarzyć, że tubulina na wolnym końcu mikrotubuli hydrolizuje własny GTP, zanim przyłączy się następna tubulina, tak iż wolny koniec protofilamentu może zawierać nowe podjednostki tubuliny–GDP. To przechyla równowagę na korzyść demontażu. Ponieważ pozostała część mikrotubuli zawiera tubulinę–GDP, to raz rozpoczęta depolimeryzacja będzie miała tendencję do kontynuacji, często w katastrofalnym tempie; mikrotubule zaczynają się raptownie skracać i mogą nawet zupełnie zaniknąć (rys. 16-12). Cząsteczki tubuliny zawierające GDP uwolnione w wyniku depolimeryzacji mikrotubul dołączają do puli niespolimeryzowanych cząsteczek w cytozolu. Mogą one następnie wymienić związany GDP na GTP i w ten sposób stać się na nowo zdolne do połączenia z inną mikrotubulą, która jest właśnie w fazie wzrostu.

Jakie jest więc znaczenie takiego zachowania? Konsekwencją dynamicznej niestabilności jest to, że centrosom (lub inny ośrodek organizacji) stale wysuwa nowe mikrotubule w celach rozpoznawczych w różnych kierunkach, a następnie likwiduje je. Mikrotubula rosnąca z centrosomu na zewnątrz może być chroniona przed demontażem, jeśli jej koniec plus jest w jakiś sposób ustawicznie stabilizowany przez przyłączenie do innej cząsteczki lub struktury komórki. Jeśli mikrotubula jest stabilizowana poprzez przyłączenie do struktury występującej w bardziej odległym regionie komórki, to zapewnia ona względnie stabilne połączenie między tą strukturą a centrosomem (rys. 16-13). Centrosom można porównać do wędkarza zarzucającego wędkę; jeśli haczyk nie zostanie połknięty przez rybę, rybak ponownie zarzuca wędkę. Ale jeśli ryba chwyci, żyłka pozostaje w miejscu łącząc rybę z wędkarzem. Ta prosta strategia przypadkowych poszukiwań i wybiórczej stabilizacji umożliwia centrosomowi i innym ośrodkom nukleacji utworzenie wysoko zorganizowanego systemu mikrotubul łączących określone części komórki. Jak zaraz zobaczymy, system ten jest wykorzystywany do ustawienia przestrzennego organelli względem siebie.

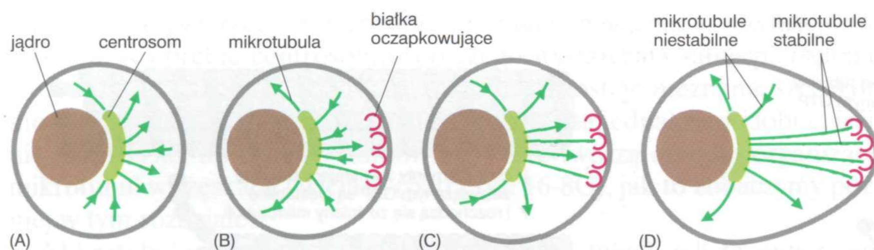
Pytanie 16-3. Dynamiczna niestabilność powoduje, że mikrotubule albo rosną, albo gwałtownie się skracają. Rozważ pojedynczą tubulę w stadium skracania się.

A. Co musi się stać na końcu mikrotubuli, aby przestała się skracać, a zaczęła rosnąć?

B. Jak zmiana w stężeniu tubuliny mogłaby wpłynąć na ten proces?

C. Co by się stało, jeśli w roztworze byłby obecny tylko GDP, a nie GTP?

D. Co by się stało, gdyby roztwór zawierał analog GTP, który nie jest w stanie ulec hydrolizie?



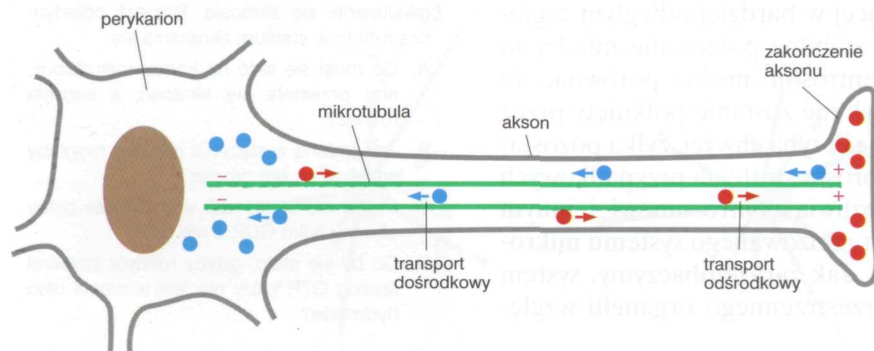
Rys. 16-13. Selektywna stabilizacja mikrotubul może spolaryzować komórkę. Nowo uformowana mikrotubula przetrwa jedynie, jeśli oba jej końce są chronione przed depolimeryzacją. W komórkach końce minus mikrotubuli są zazwyczaj chronione przez ośrodki organizacji, z których te filamenty wyrastają. Końce plus są początkowo swobodne, ale mogą być stabilizowane poprzez inne białka. W (A) przedstawiono niespolaryzowaną komórkę z nowymi mikrotubulami wyrastającymi z centrosomu i skracającymi się na powrót, i to w wielu przypadkowych kierunkach. Niektóre z tych mikrotubul przez przypadek napotykają białka (białka oczapkowujące) w specyficznym regionie kory komórki, które mogą związać i ustabilizować wolny koniec plus mikrotubuli (B). Ta selektywna stabilizacja prowadzi do szybkiej zmiany orientacji układów mikrotubul (C) i przekształca komórkę w wysoce spolaryzowaną formę (D)

Mikrotubule organizują wnętrze komórki

Komórki są zdolne do modyfikowania dynamicznej niestabilności swoich mikrotubul w szczególnych celach. Jeśli komórka wchodzi w stadium mitozy, mikrotubule stają się początkowo bardziej dynamiczne, balansując między wzrostem a skracaniem się o wiele częściej niż zwykle robią to mikrotubule cytoplazmatyczne.Umożliwia to im szybki demontaż i ponowny montaż we wrzeciono mitotyczne. Z drugiej strony, kiedy komórka zróżnicowała się w wyspecjalizowany typ i ma zdefiniowaną, ustaloną strukturę, dynamiczna niestabilność jej mikrotubul jest zazwyczaj ograniczona przez białka, które wiążą się z końcami mikrotubul lub wzdłuż ich przebiegu, co chroni przed demontażem. Ustabilizowane mikrotubule mogą służyć utrzymaniu organizacji komórki.

Najbardziej zróżnicowane komórki zwierzęce są *spolaryzowane*: np. komórki nerwowe, tworzące aksony z jednej strony, a dendryty z drugiej; komórki wyspecjalizowane w kierunku sekrecji mające aparat Golgiego usytuowany naprzeciw miejsca wydzielania itd. Polarność komórek jest odbiciem spolaryzowanego systemu mikrotubul w ich wnętrzu, który pomaga umieścić organelle w wymaganych miejscach w obrębie komórki i sterować ruchem między jedną częścią komórki a drugą. Na przykład, w komórce nerwowej wszystkie mikrotubule w aksonie są skierowane w tym samym kierunku, swoimi końcami plus ku zakończeniu aksonu (rys. 16-14). Wzdłuż tych wyznaczonych szlaków komórka jest zdolna do wysyłania „cargo” (ładunku), takiego jak pęcherzyki błoniaste czy białka sekrecyjne, które są wytwarzane w perykarionie, ale są potrzebne dużo dalej, na zakończeniu aksonu.

Niektóre rodzaje cargo są przesyłane z prędkością przekraczającą 10 cm/dzień, co jednak wciąż oznacza, że potrzeba na to tygodnia lub więcej czasu, aby cargo znalazło się na końcu długich aksonów, jakie występują u niektórych zwierząt. Taki transport wzdłuż mikrotubul jest jednak znacznie szybszy i bardziej wydajny niż wolna dyfuzja. Cząsteczki białka przemieszczające się na zasadzie wolnej dyfuzji mogą potrzebować roku, aby osiągnąć zakończenie długiego aksonu, jeśli w ogóle dotrą (patrz pytanie 16-10).

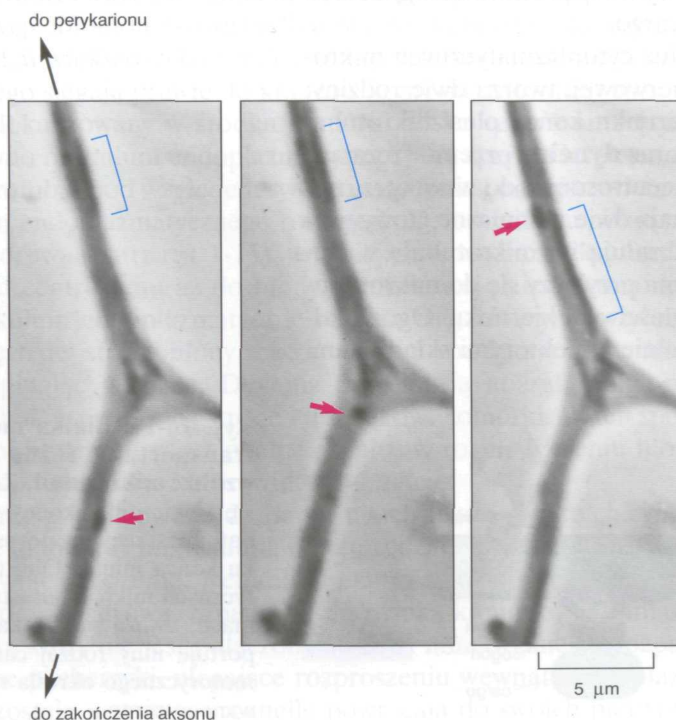


Rys. 16-14. Transport wzdłuż mikrotubul w aksonie komórki nerwowej. W komórce nerwowej wszystkie mikrotubule w aksonie (od jednej do setek) są skierowane w tę samą stronę swoimi końcami plus; w kierunku zakończenia aksonu. Zorientowana mikrotubula służy jako szlak dla ukierunkowanego transportu materiałów syntetyzowanych w perykarionie, ale niezbędnych na zakończeniu aksonu (takich jak białka błonowe niezbędne do wzrostu). W przypadku aksonu biegnącego z twojego rdzenia kręgowego do mięśnia w twoim ramieniu taka podróż zabiera około dwóch dni. Na dodatek do tego *odśrodkowego* ruchu materiału prowadzonego przez jeden zestaw białek motorycznych (*czerwone kółka*) istnieje również ruch *dośrodkowy* w odwrotnym kierunku prowadzony przez inny zestaw białek (*niebieskie kółka*). Ruch dośrodkowy przenosi materiał pochłonięty przez zakończenie aksonu lub powstały przez rozpad białek bądź innych cząsteczek — na powrót do ciała komórki

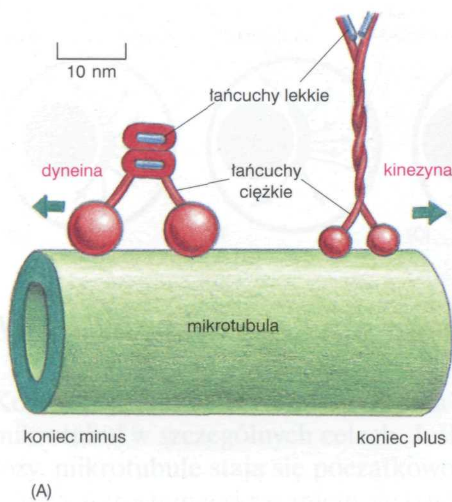
Należy sobie również uświadomić, że mikrotubule w żywych komórkach nie działają w izolacji. Ich funkcje, tak jak i innych filamentów cytoszkieletu, zależą od dużej różnorodności białek dodatkowych, które wiążą się z mikrotubulami i pełnią różne role. Niektóre białka łącząc się z mikrotubulami stabilizują mikrotubule zapobiegając ich demontażowi, inne natomiast wiążą mikrotubule z innymi strukturami komórki, w tym także z innymi typami filamentów wchodzących w skład cytoszkieletu. Stąd wszystkie składniki cytoszkieletu mogą wchodzić w interakcje, a ich funkcje mogą być skoordynowane. Mikrotubule wpływają również na rozmieszczenie błon w komórce eukariotycznej, szczególnie za pośrednictwem białek motorycznych towarzyszących mikrotubulom, które poruszają się wzdłuż mikrotubul. Tak jak to zaraz omówimy, białka motoryczne zużytkowują energię pochodzącą z hydrolizy ATP, aby transportować organelle, pęcherzyki czy inny materiał komórkowy wzdłuż szlaków utworzonych w cytoplazmie przez filamenty aktynowe i mikrotubule.

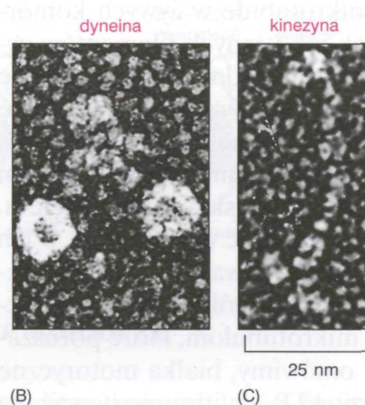
Białka motoryczne kierują wewnątrzkomórkowym transportem

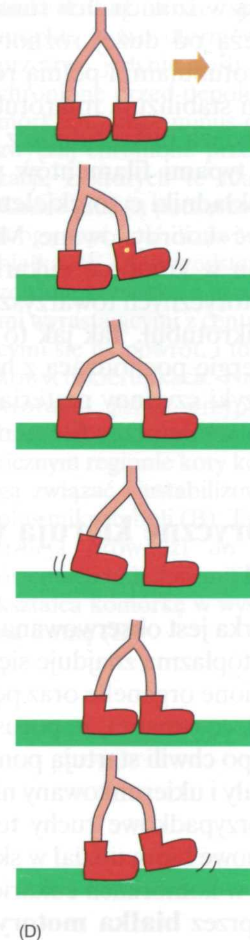
Jeśli żywa komórka jest obserwowana w mikroskopie świetlnym, można zauważyć, że jej cytoplazma znajduje się w nieustannym ruchu: mitochondria i mniejsze obłonione organelle oraz pęcherzyki są przesuwane małymi, skokowymi ruchami, co oznacza, że poruszają się przez krótki okres, następnie zatrzymują się i po chwili startują ponownie (rys. 16-15). Ten *skokowy ruch* jest bardziej trwały i ukierunkowany niż stałe, drobne ruchy Browna spowodowane przez przypadkowe ruchy termiczne. Zarówno mikrotubule, jak i filamenty aktynowe biorą udział w skokowym czy przejawiającym się w inny sposób ruchu w komórkach eukariotycznych. W obu przypadkach ruchy są generowane przez **białka motoryczne**, które wiążą się z filamentami aktynowymi lub mikrotubulami i zużywają energię uzyskaną z powtarzających się cykli hydrolizy ATP, aby przemieszczać się wzdłuż filamentu akty-



Rys. 16-15. Ruchy wewnątrzkomórkowych organelli. Trzy fotografie aksonu żywej komórki nerwowej, wykonane w czasie krótszym niż jedna minuta pomiędzy pierwszą i ostatnią klatką filmu. *Czerwona strzałka* wskazuje na dużą, obłonioną organellę przemieszczającą się skokowo na powrót do perykarionu. *Niebieska klamra* wskazuje na mitochondrium, które powoli przemieszcza się odśrodkowo w kierunku zakończenia aksonu. (Dzięki uprzejmości: Peter J. Hollenbeck. Reprodukcja z *The Journal of Cell Biology* 121: 307, 1993, za zgodą The Rockefeller University Press)



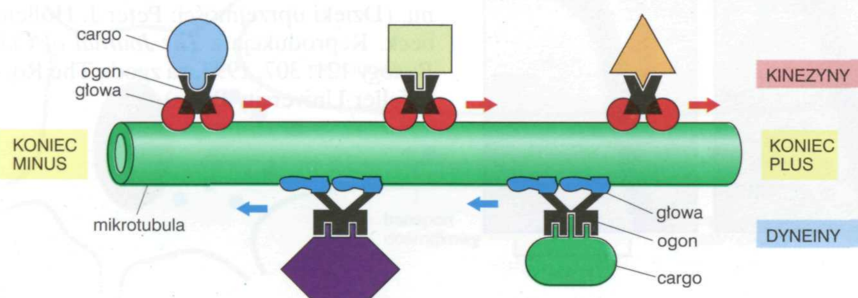




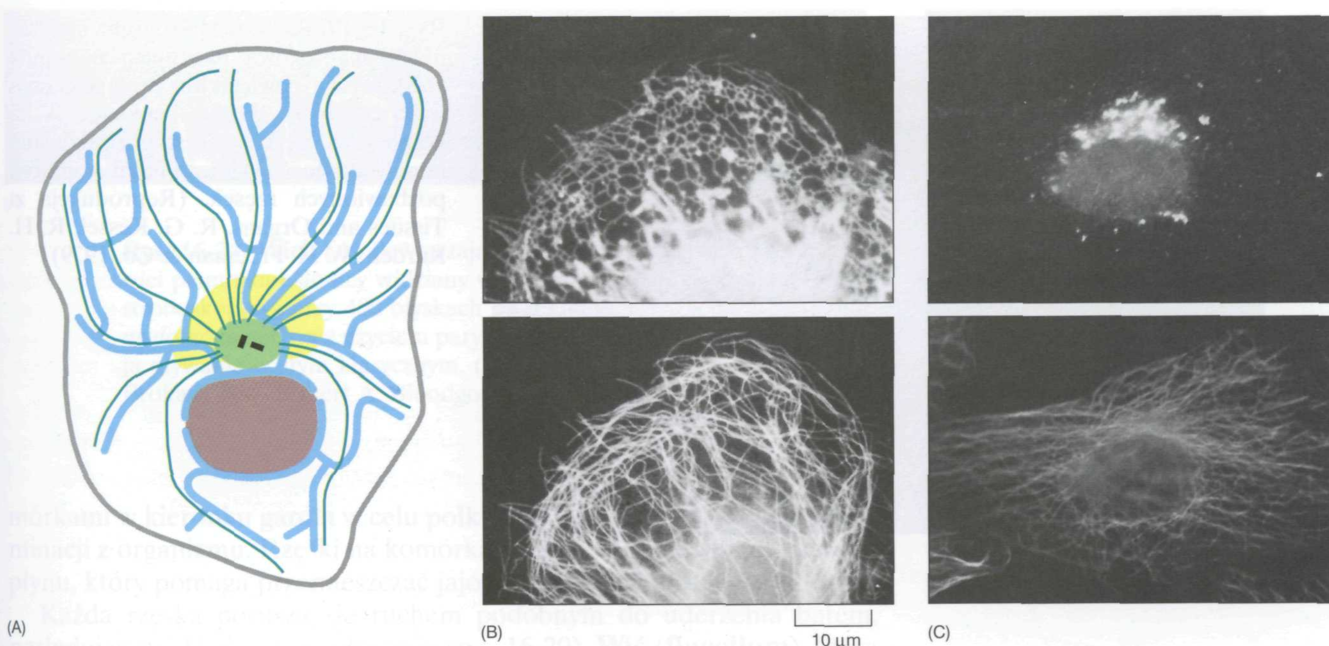
Rys. 16-16. Białka motoryczne mikrotubul. (A) Kinezyny i cytoplazmatyczne dyneiny są białkami motorycznymi mikrotubul, które z reguły przemieszczają się wzdłuż mikrotubul w odwrotnych kierunkach. Te białka (narysowane w skali) są kompleksami złożonymi z dwóch identycznych łańcuchów ciężkich oraz wielu mniejszych łańcuchów lekkich. Każdy łańcuch ciężki tworzy globularną głowę, która oddziałuje z mikrotubulą. (B) Mikrografia elektronowa z zastosowaniem wytrawiania w zamrożeniu przedstawiająca cząsteczkę cytoplazmatycznej dyneiny. (C) Mikrografia elektronowa z zastosowaniem wytrawiania w zamrożeniu przedstawiająca cząsteczkę kinezyny. (D) Diagram białka motorycznego przedstawiający „kroki" wzdłuż filamentu zależne od ATP. (B i C dzięki uprzejmości: John Heuser)

nowego czy też mikrotubuli w jednym kierunku (patrz rys. 5-40). W tym samym czasie białka motoryczne łączą się również z innymi składnikami komórki i w ten sposób transportują je jako cargo wzdłuż filamentów. Zidentyfikowano już wiele białek motorycznych. Różnią się one typem filamentów, z którymi się łączą, kierunkiem, w którym się przemieszczają wzdłuż filamentów, i rodzajem transportowanego cargo.

Białka motoryczne, które wędrują wzdłuż cytoplazmatycznych mikrotubul, takich jak np. w aksonie komórki nerwowej, tworzą dwie rodziny: **kinezyny**, które przemieszczają się w kierunku końca plus mikrotubul (od centrosomu, na zewnątrz, rys. 16-14), oraz **dyneiny** przemieszczające się w kierunku końca minus (w kierunku centrosomu, do wewnątrz, rys. 16-14). Zarówno kinezyny, jak i dyneiny mają dwie globularne głowy wiążące ATP i ogon (rys. 16-16). Głowy oddziałują na mikrotubule w stereospecyficzny sposób; tak więc np. kinezyna przyłączy się do mikrotubuli, jedynie jeśli jest ona „skierowana" we właściwym kierunku. Ogon białka motorycznego zazwyczaj wiąże się stabilnie z niektórymi składnikami



Rys. 16-17. Białka motoryczne, które transportują różne rodzaje cargo wzdłuż mikrotubul. Kinezyny poruszają się w kierunku końca plus mikrotubuli, natomiast dyneiny poruszają się w kierunku końca minus. Oba typy białek motorycznych mikrotubul istnieją w wielu formach; uważa się, że każda forma transportuje inny rodzaj cargo. Ogon białka motorycznego określa rodzaj transportowanego cargo



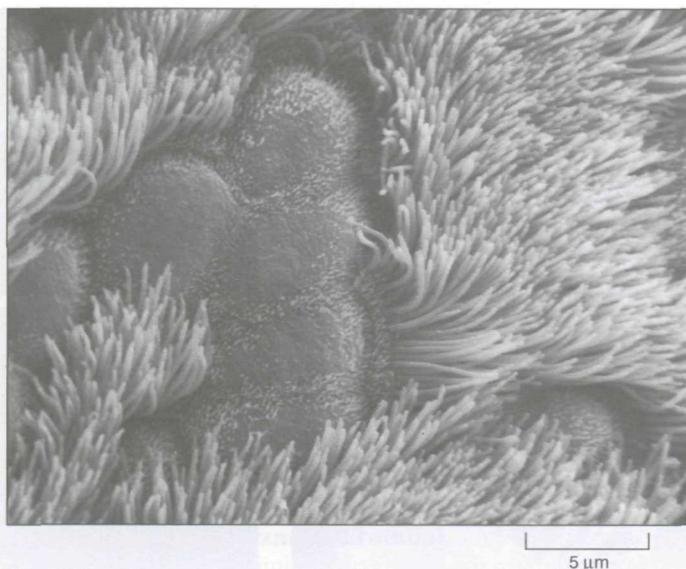
komórki, takimi jak np. pęcherzyki lub organelle, i w ten sposób determinuje rodzaj cargo, jaki może być transportowany przez to białko motoryczne (rys. 16-17). Kuliste głowy kinezyny i dyneiny są enzymami hydrolizującymi ATP (ATPazami). Ta reakcja dostarcza energii do cyklu zmian konformacyjnych w głowie, co umożliwia jej przesuwanie się wzdłuż mikrotubul poprzez cykl: wiązanie, uwalnianie i ponowne wiązanie z mikrotubulą (patrz rys. 5-40).

Rys. 16-18. Rozmieszczanie organelli przez mikrotubule. (A) Schematyczny diagram komórki ukazujący typową organizację mikrotubul (kolor *ciemnozielony*), retikulum endoplazmatycznego (kolor *niebieski*) i aparatu Golgiego (kolor *żółty*). Jądro ukazano w kolorze *brązowym*, a centrosom — *jasnozielonym*. (B) Komórki wybarwione z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko retikulum endoplazmatycznemu (*panel górny*) i mikrotubulom (*panel dolny*). Białka motoryczne ciągną retikulum endoplazmatyczne na zewnątrz wzdłuż mikrotubul. (C) Komórka wybarwiona z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko aparatowi Golgiego (*panel górny*) i mikrotubulom (*panel dolny*). W tym przypadku białka motoryczne przemieszczają aparat Golgiego do wnętrza komórki, do jego właściwej pozycji w pobliżu centrosomu. (Dzięki uprzejmości: B — Mark Terasaki, Lan Bo Chen, Keigi Fujiwara; C — Viki Allan, Thomas Kreis)

Organelle są transportowane wzdłuż mikrotubul

Mikrotubule i towarzyszące im białka motoryczne odgrywają istotną rolę w ustalaniu pozycji obłonionych organelli w obrębie komórki eukariotycznej. Na przykład, w większości komórek zwierzęcych tubule retikulum endoplazmatycznego sięgają prawie do krańców komórki, natomiast aparat Golgiego jest zlokalizowany w środku komórki blisko centrosomu (rys. 16-18A). Zarówno retikulum endoplazmatyczne, jak i aparat Golgiego są zależne od mikrotubul pod względem swego ustawienia i umiejscowienia. Błony retikulum endoplazmatycznego rozciągają się od miejsca połączenia z otoczką jądrową (patrz rys. 1-15), ustawiając się wzdłuż mikrotubul, które sięgają od centrosomu aż do błony komórkowej. Kiedy komórka dojrzewa i retikulum endoplazmatyczne rozrasta się, kinezyny przyczepione do zewnętrznej strony błony tego retikulum rozciągają go wzdłuż mikrotubul, napinając jak sieć. Dyneiny przeciągają aparat Golgiego wzdłuż mikrotubul, w przeciwną stronę ku środkowi komórki. W ten sposób są stworzone i utrzymywane lokalne różnice w rozmieszczeniu błon wewnętrznych, co warunkuje ich prawidłową funkcję.

Kiedy komórki są poddawane działaniu takich leków jak kolchicyna, która powoduje demontaż mikrotubul, oba te rodzaje organelli drastycznie zmieniają swoje położenie. Retikulum endoplazmatyczne, które ma połączenia z otoczką jądrową, zapada się do środka komórki, natomiast aparat Golgiego, który nie jest połączony z żadną inną organellą, rozpada się na drobne pęcherzyki, ulegające rozproszeniu wewnątrz cytoplazmy. Kiedy lek zostaje usunięty, organelle powracają do swoich pierwot-

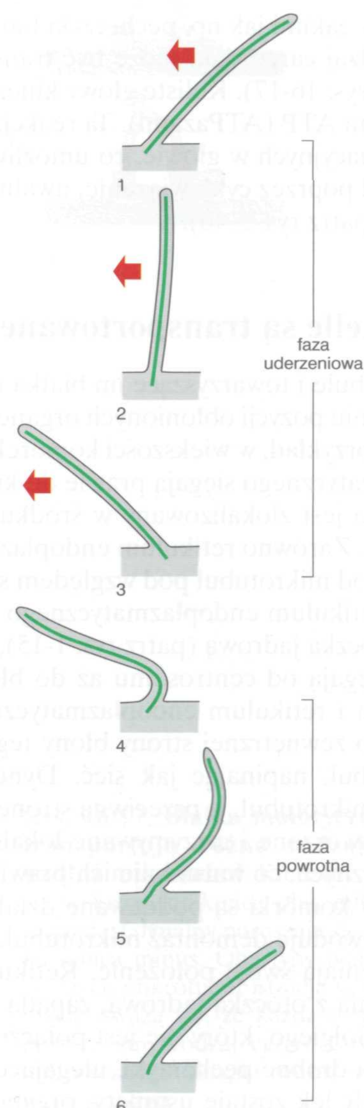


Rys. 16-19. Rzęski. Mikrografia elektronowa skaningowa ukazująca nabłonek rzęskowy na powierzchni dróg oddechowych człowieka. Grube kępki rzęsek na komórkach rzęskowych są porozdzielane kopułowatymi powierzchniami komórek pozbawionych rzęsek. (Reprodukcja z: Tissues and Organs, R. G. Kessel, R. H. Karden; W. H. Freeman & Co, 1979)

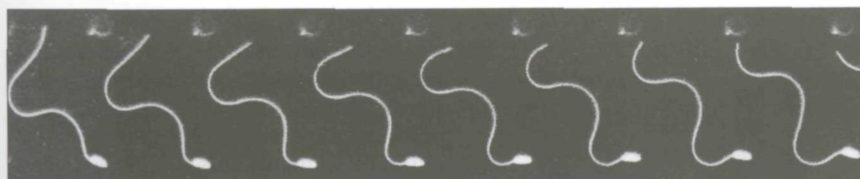
nych pozycji, ciągnięte przez białka motoryczne przemieszczające się wzdłuż na nowo uformowanych mikrotubul. Prawidłowe ulokowanie tych organelli odbywa się za pośrednictwem zawartych w ich błonach białek receptorowych, które wiążą się z białkami motorycznymi — kinezynami dla retikulum endoplazmatycznego i dyneinami dla aparatu Golgiego.

Rzęski i wici zawierają stabilne mikrotubule przemieszczane przez dyneinę

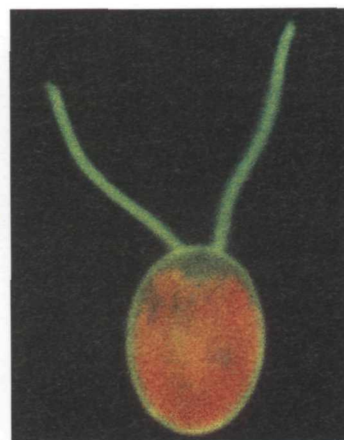
Wcześniej w tym rozdziale wspominaliśmy, że wiele mikrotubul w komórkach jest stabilizowanych poprzez ich połączenie z innymi białkami i stąd nie wykazuje dynamicznej niestabilności. Stabilne mikrotubule są wykorzystywane przez komórki jako sztywne wsporniki do konstrukcji wielu spolaryzowanych struktur, w tym rzęsek i wici, które umożliwiają komórkom eukariotycznym przemieszczanie wody ponad ich powierzchnią. **Rzęski (cilia)** są włosopodobnymi strukturami o średnicy ok. 0,25 µm, występującymi na powierzchni wielu rodzajów komórek eukariotycznych. Pojedyncza rzęska zawiera rdzeń ze stabilnych mikrotubul zebranych w pęczek, wyrastający z *ciałka podstawnego* umiejscowionego w cytoplazmie, które jest ośrodkiem organizacyjnym dla rzęski. Cała rzęska jest otoczona przez błonę komórkową (patrz rys. 16-8C). Pierwotną funkcją rzęski jest przemieszczanie płynu ponad powierzchnią komórki lub nadawanie ruchu komórce w płynie. Na przykład, niektóre pierwotniaki używają rzęsek zarówno do wychwytywania cząstek pokarmowych, jak i do lokomocji. Na komórkach nabłonkowych wyścielających drogi oddechowe człowieka (rys. 16-19) olbrzymia liczba rzęsek (ponad miliard na cm^2) przesuwa warstwy śluzu z wychwyconymi cząstkami kurzu i martwymi ko-



Rys. 16-20. Bicie rzęski. Każda rzęska odbywa powtarzający się cykl ruchów składający się z fazy uderzeniowej, po której następuje faza powrotna. W szybkiej fazie uderzeniowej rzęska jest w pełni rozciągnięta i płyn omywa powierzchnię komórki; w wolniejszej fazie powrotnej rzęska „kuli się” do pozycji zapewniającej minimalne zakłócenie otaczającego płynu. Każdy cykl typowo zajmuje 0,1–0,2 sekundy i generuje siłę skierowaną prostopadle do osi rzęski



(A)



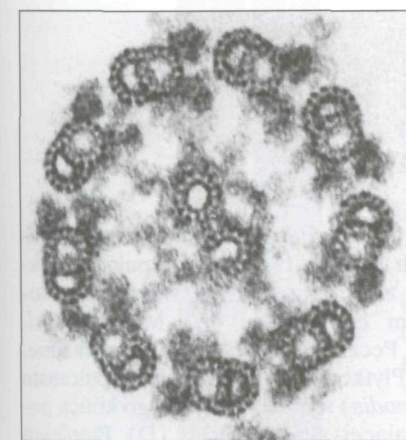
Rys. 16-21. Wici. (A) Powtarzający się falopodobny ruch pojedynczej wici plemnika osłonicy widziany w serii obrazów uzyskanych techniką stroboskopową przy 400 błyskach na sekundę. (B) Zielony glon *Chlamydomonas* pływa z użyciem pary wici, których uderzenia przypominają pływanie w stylu klasycznym. (Dzięki uprzejmości: A — Charles J. Brokaw; B — Robert A. Bloodgood)

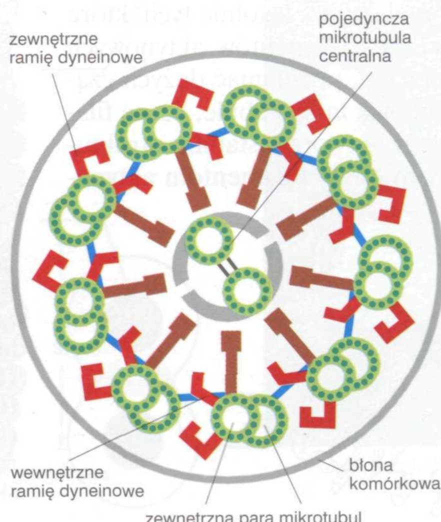
mórkami w kierunku gardła w celu połknięcia i — w konsekwencji — eliminacji z organizmu. Rzęski na komórkach jajowodu powodują przepływ płynu, który pomaga przemieszczać jajo wzdłuż jajowodu.

Każda rzęska porusza się ruchem podobnym do uderzenia batem, naśladując styl klasyczny w pływaniu (rys. 16-20). **Wić (flagellum)**, która jest napędem plemników i wielu pierwotniaków, przypomina rzęskę pod względem struktury wewnętrznej, ale jest zazwyczaj dużo dłuższa. Wici są przeznaczone do ruchu całej komórki. Zamiast ruchów typu bata przenoszą one bardziej regularne fale ruchu wzdłuż swojej długości, co umożliwia przemieszczanie komórki w płynie (rys. 16-21).

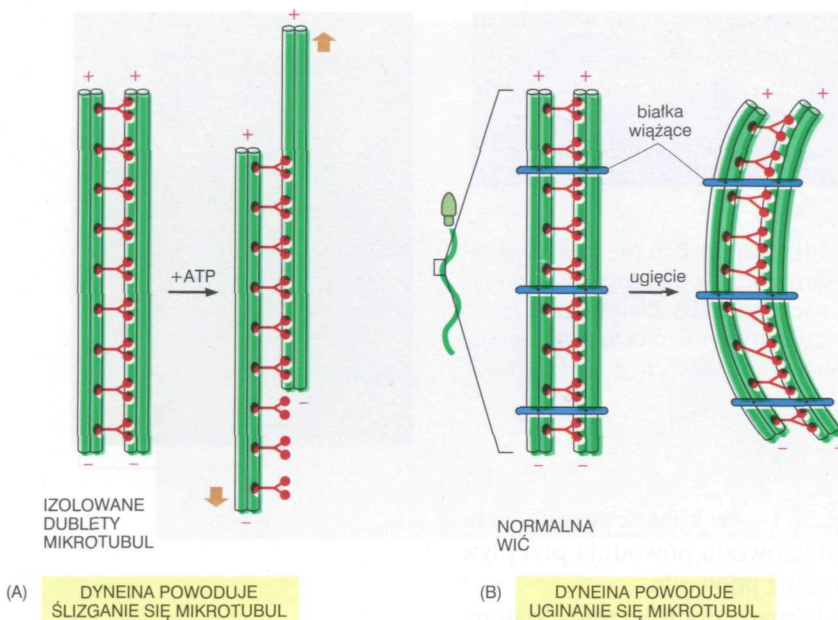
Mikrotubule w rzęskach i wiciach różnią się nieco od mikrotubul cytoplazmatycznych. Są zorganizowane w osobliwy i charakterystyczny wzór, który był jedną z najbardziej uderzających rewelacji wczesnych odkryć, jakie umożliwił mikroskop elektronowy. Przekrój poprzeczny rzęski ukazuje 9 dubletów mikrotubul tworzących pierścień dookoła pary pojedynczych mikrotubul (rys. 16-22A). Ten wzór „9 + 2" jest charakterystyczny niemal dla wszystkich form eukariotycznych rzęsek i wici, od znajdowanych u pierwotniaków do tych, które występują u ludzi.

Ruch rzęski lub wici jest rezultatem zginania się ich rdzenia, spowodowanego ślizganiem się mikrotubul jedna na drugiej. Mikrotubulom towarzyszą liczne białka, które lokalizują się w miejscach usytuowanych regu-





Rys. 16-22. Organizacja mikrotubul w rzęsce lub wici. (A) Mikrografia elektronowa wici *Chlamydomonas* widziana w przekroju poprzecznym, ukazująca wyraźny układ mikrotubul „9 + 2". (B) Diagram wici w przekroju poprzecznym. Dziewięć zewnętrznych mikrotubul (każda o specjalnej strukturze dubletu) ma dwa rzędy cząsteczek dyneiny. Głowy tych dynein wyglądają na tym przekroju jak pary ramion wyciągających się w kierunku przylegającej mikrotubuli. W żywej rzęsce te głowy okresowo kontaktują się z przylegającą mikrotubulą i przesuwają się wzdłuż niej, wytwarzając w ten sposób siłę do bicia rzęski. Różne inne połączenia i widoczne elementy wystające są białkami służącymi do utrzymywania pęczka mikrotubul razem i do przekształcania ruchów ślizgowych wytwarzanych przez dyneiny w wyginanie, jak to zilustrowano na ryc. 16-23. (A dzięki uprzejmości: Lewis Tilney)



Rys. 16-23. Ruch dyneiny powoduje wyginanie się wici. (A) Jeśli zewnętrzny dublet mikrotubul i towarzyszące im cząsteczki dyneiny pozbawi się innych składników wici plemnika, a podda się działaniu ATP, dublety ślizgają się względem siebie, ruchem teleskopowym, w wyniku powtarzających się ruchów towarzyszących im dynein. (B) Natomiast w nietkniętej wici dublety są połączone ze sobą poprzez elastyczne białka związane w ten sposób, że działanie układu powoduje raczej uginanie się, a nie ślizganie mikrotubul

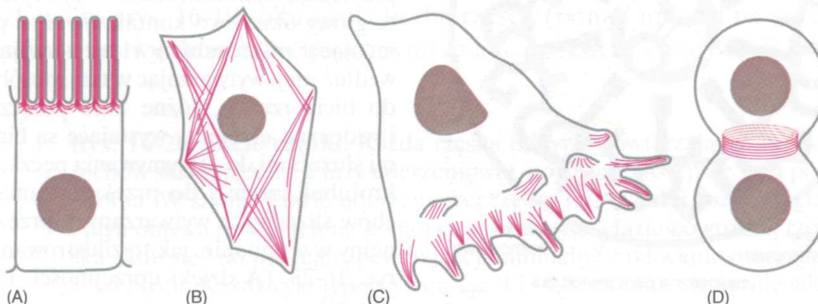
larnie wzdłuż całej długości pęczka mikrotubul (rys. 16-22B). Niektóre z nich służą jako wiązania poprzeczne, aby utrzymywać wiązkę mikrotubul razem, inne natomiast wytwarzają siły powodujące zginanie się rzęski.

Najważniejszym z tych białek towarzyszących jest motoryczne białko *dyneina rzęskowa,* która generuje ruch zginający rdzenia. Przypomina ona dyneinę cytoplazmatyczną i funkcjonuje w ten sam sposób. Dyneina jest połączona za pomocą swojego ogona do jednej mikrotubuli, natomiast jej głowa wchodzi w interakcję z przylegającą mikrotubulą wytwarzając siłę ślizgową między tymi dwoma mikrotubulami. Z powodu wielu połączeń, które utrzymują sąsiednie dublety mikrotubul razem, prosty równoległy ruch ślizgowy między dwoma wolnymi mikrotubulami jest przekształcany w ruch zginający rzęskę (rys. 16-23).

Pytanie 16-4. Ramiona dyneiny w rzęsce są ustawione w taki sposób, że w momencie swej aktywacji głowy popychają sąsiadujący z nimi zewnętrzny dublet w kierunku wierzchołka rzęski. Rozważ przekrój poprzeczny rzęski (rys. 16-22). Dlaczego nie doszłoby do ruchu ugięcia rzęski, gdyby wszystkie cząsteczki dyneiny były aktywne w tym samym czasie? Zaproponuj model aktywności dyneiny — zgodny z kierunkiem popychania dyneiny (patrz rys. 16-23) i strukturą rzęski, który może tłumaczyć uginanie się rzęski w jednym kierunku.

Filamenty aktynowe

Filamenty aktynowe są znajdowane we wszystkich komórkach eukariotycznych i są niezbędne do wykonywania wielu ruchów, szczególnie tych, które dotyczą powierzchni komórki. Na przykład, bez filamentów aktynowych komórka nie jest w stanie pełzać po powierzchni, pochłaniać dużych cząstek przez fagocytozę lub dzielić się. Podobnie jak mikrotubule, liczne filamenty aktynowe są niestabilne, ale potrafią także tworzyć stabilne struktury w komórkach, takie jak aparat kurczliwy mięśnia. Filamentom aktyno-



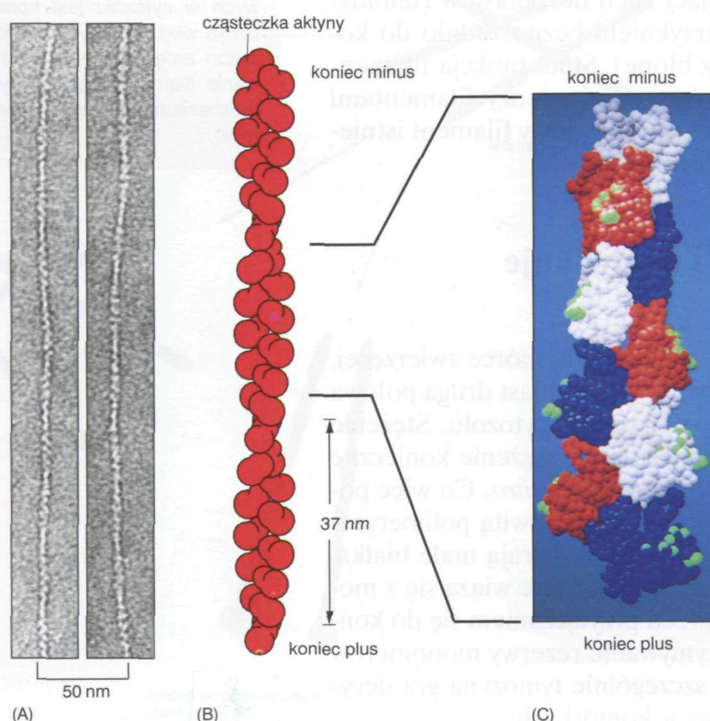
Rys. 16-24. Pęczki filamentów aktynowych w komórkach. Następujące struktury zawierające aktynę zaznaczono kolorem *czerwonym*. (A) Mikrokosmki. (B) Pęczki skurczowe w cytoplazmie. (C) Płytkowate (*lamellipodia*) i palczaste (*filopodia*) wypustki wiodącego końca poruszającej się komórki. (D) Pierścień skurczowy podczas podziału komórki

wym towarzyszy duża liczba *białek wiążących się z aktyną*, które umożliwiają filamentom wykonywanie wielu funkcji w komórkach. Zależnie od ich połączeń z różnymi białkami filamenty aktynowe mogą tworzyć sztywne i względnie trwałe struktury, takie jak: 1) *mikrokosmki* umiejscowione na szczytowej powierzchni komórek rąbka szczoteczkowego wyścielającego jelito (rys. 16-24A), 2) małe *pęczki kurczliwe* w cytoplazmie, które są zdolne do skurczu i działają jak „mięśnie" komórki (rys. 16-24B), 3) tymczasowe struktury takie jak uwypuklenia, które powstają na wiodącym końcu pełzającego fibroblastu (rys. 16-24C), lub 4) *pierścienie skurczowe*, które dzielą cytoplazmę na dwie części w momencie podziału komórki (rys. 16-24D). O tym, która z wielu form możliwej organizacji filamentów aktynowych istnieje w komórce, decyduje to, jaki rodzaj białek wiążących się z aktyną jest w danej komórce obecny. Mimo że filamenty aktynowe i mikrotubule są utworzone z niezależnych rodzajów białek, zobaczymy uderzające podobieństwo reguł, zgodnie z którymi formują się one i demontują, kontrolują strukturę komórki i doprowadzają do ruchu.

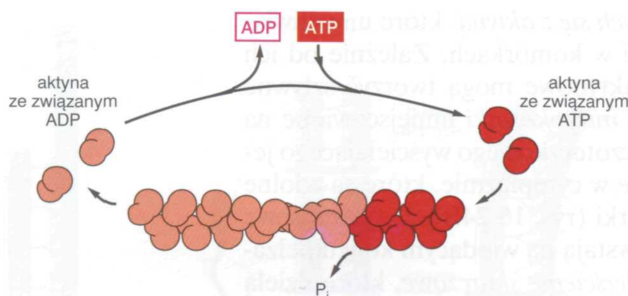
Filamenty aktynowe są cienkie i giętkie

Filamenty aktynowe są widoczne w mikroskopie elektronowym jako nitki o średnicy ok. 7 nm. Każdy filament jest skręconym łańcuchem identycznych globularnych cząsteczek aktyny, z których wszystkie „celują" w tym samym kierunku wzdłuż osi łańcucha. Zatem, podobnie jak mikrotubule, filamenty aktynowe mają strukturalną biegunowość, z końcem plus i końcem minus (rys. 16-25).

Filamenty aktynowe są cieńsze, bardziej elastyczne i zazwyczaj krótsze niż mikrotubule. W komórce jest znacznie więcej pojedynczych filamentów aktynowych aniżeli mikrotubul. Całkowita długość wszystkich filamentów aktynowych w komórce jest co najmniej 30 razy większa niż całkowita długość wszystkich mikrotubul. Filamenty aktynowe rzadko występują w komórce pojedynczo, najczęściej są umiejscowione w poprzecznie powiązanych pęczkach i sieciach, które są znacznie silniejsze aniżeli pojedyncze filamenty.



Rys. 16-25. Filamenty aktynowe. (A) Mikrografia elektronowa barwionych negatywowo filamentów aktynowych. (B) Organizacja cząsteczek aktyny w filament aktynowy. Każdy filament może być uważany za dwuniciową helisę z pełnym obrotem co 37 nm. Silne interakcje dwóch nitek zapobiegają ich rozdzieleniu. (C) Identyczne podjednostki filamentów aktynowych są przedstawione w różnych kolorach, aby podkreślić bliskie interakcje każdej cząsteczki aktyny z jej czterema najbliższymi sąsiadami. (A — dzięki uprzejmości: Roger Craig; C — z: K. C. Holmes et al. *Nature* 347: 44–49, 1990, copyright Macmillan Magazines Ltd.)



Rys. 16-26. Hydroliza ATP podczas polimeryzacji aktyny. Monomery aktyny w cytozolu niosą ATP, który jest hydrolizowany do ADP zaraz po zmontowaniu rosnącego filamentu. Cząsteczki ADP pozostają uwięzione w obrębie filamentu aktynowego, niezdolne do wymiany z ATP aż do czasu, kiedy monomery aktyny, który je niosą, oddysocjują z filamentu

Aktyna i tubulina polimeryzują według podobnego mechanizmu

Filamenty aktynowe mogą rosnąć przez przyłączanie monomerów aktynowych do każdego z końców, ale tempo wzrostu jest szybsze przy końcu plus niż przy końcu minus. Nagi filament aktynowy, podobnie jak mikrotubula, bez białek towarzyszących, jest z natury niestabilny i może ulegać demontażowi z obu końców. Każdy wolny monomer aktynowy niesie ściśle związany trifosforan nukleozydu, w tym przypadku ATP, który jest hydrolizowany do ADP wkrótce po przyłączeniu monomeru aktyny do filamentu. Podobnie jak w przypadku tubuliny-GTP, hydroliza związanego ATP do ADP w filamencie aktynowym zmniejsza wytrzymałość połączeń między monomerami oraz stabilność polimeru. W ten sposób hydroliza nukleotydu ułatwia depolimeryzację, pomagając komórce w demontażu filamentów po ich uformowaniu się (rys. 16-26).

Podobnie jak to dotyczyło mikrotubul, zdolność do montażu i demontażu jest niezbędna do wielu funkcji wykonywanych przez filamenty aktynowe, takich jak ich udział w ruchach komórki. Funkcja filamentów aktynowych może być zakłócona eksperymentalnie przez toksyny grzybów — zarówno takie, które zapobiegają polimeryzacji aktyny, jak *cytochalazyny*, jak i takie, które stabilizują filamenty aktynowe zapobiegając depolimeryzacji, jak *faloidyny*. Dodanie cytochalazyny w małym stężeniu natychmiast zamraża ruch komórki, taki jak np. pełzający ruch fibroblastów (faloidyna daje podobny efekt, ale musi być wstrzyknięta bezpośrednio do komórki, ponieważ nie przenika łatwo przez błonę). Stąd, funkcja filamentów aktynowych zależy od dynamicznej równowagi między filamentami aktynowymi a pulą monomerów aktyny, ponieważ typowy filament istnieje tylko przez kilka minut od momentu uformowania.

Pytanie 16-5. Tworzenie filamentów aktynowych w cytozolu jest kontrolowane przez białka wiążące aktynę. Niektóre z nich znacząco zwiększają szybkość inicjacji formowania filamentów aktynowych. Zaproponuj mechanizm, za pomocą którego mogłyby to robić.

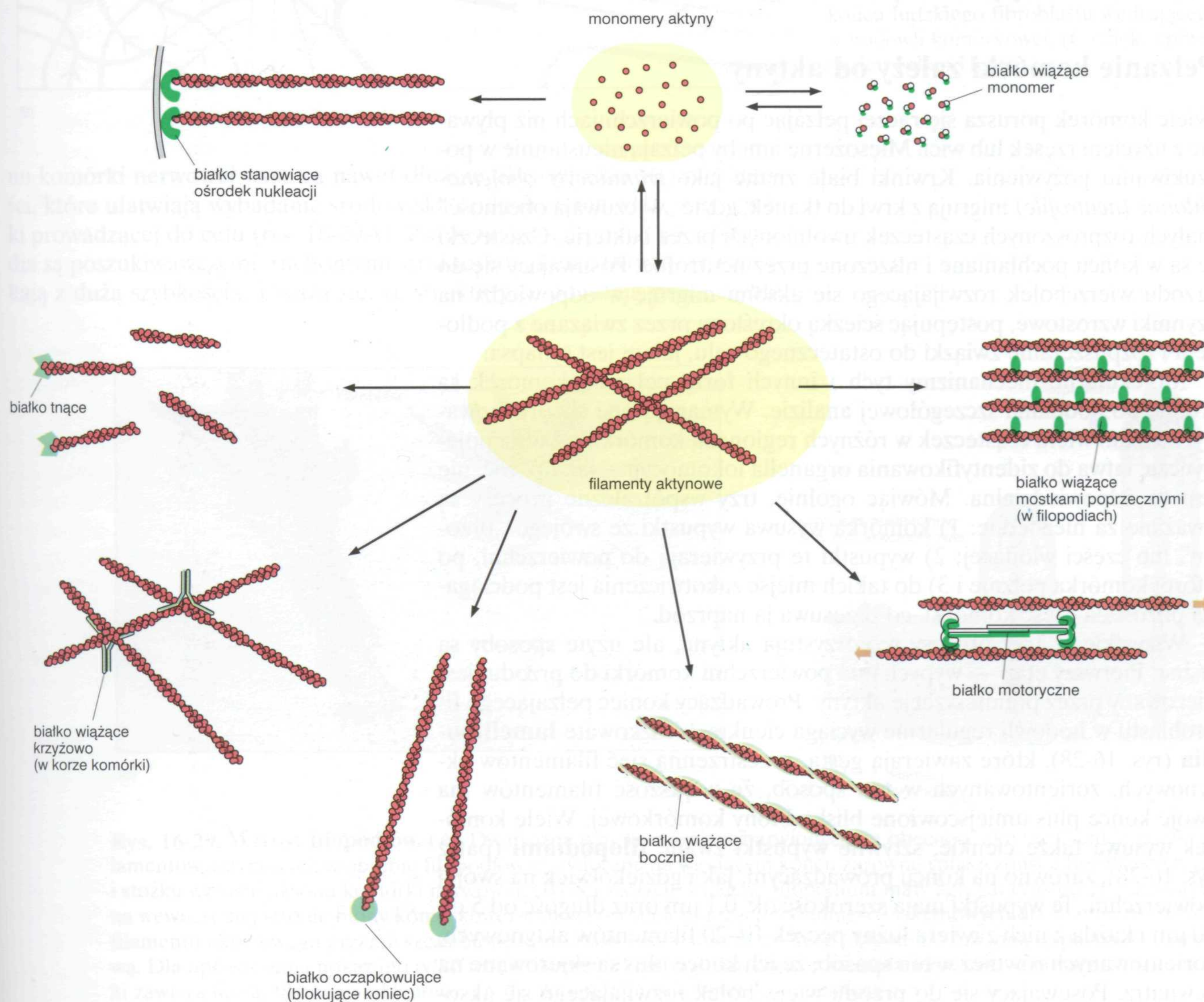
Wiele białek wiąże się z aktyną i modyfikuje jej właściwości

Aktyna stanowi ok. 5% wszystkich białek w typowej komórce zwierzęcej, prawie połowa z tego tworzy filamenty aktynowe, natomiast druga połowa występuje w postaci wolnej jako monomery aktyny w cytozolu. Stężenie monomerów jest zatem duże — znacznie większe niż stężenie konieczne do polimeryzacji oczyszczonych monomerów aktyny *in vitro*. Co więc powstrzymuje monomery aktyny w komórkach przed całkowitą polimeryzacją w filamenty? Odpowiedzią jest to, że komórki zawierają małe białka, jak *tymozynę* i *profilinę* (ang. sequestering proteins), które wiążą się z monomerami aktyny w cytozolu, chroniąc je przed przyłączaniem się do końców filamentów aktynowych. Poprzez utrzymywanie rezerwy monomerów aktyny do czasu, kiedy są one potrzebne, szczególnie tymozyna gra decydującą rolę w regulacji polimeryzacji aktyny w komórkach.

W komórkach znajduje się również olbrzymia ilość innych białek wiążących się z aktyną. Większość z nich wiąże się raczej z uformowanymi filamentami aktynowymi aniżeli z monomerami aktyny i kontroluje zachowanie filamentów (rys. 16-27). Na przykład, białka wiążące aktynę w pęczki utrzymują filamenty aktynowe razem w równoległych pęczkach w mikrokosmkach; białka wiążące poprzecznie trzymają razem filamenty aktynowe w żelopodobnej sieci w obrębie kory komórki — warstwy cytoplazmy, tuż pod błoną komórkową; białka tnące filamenty, jak *gelsolina,* tną filamenty aktynowe na krótsze fragmenty i w ten sposób zmieniają żel aktynowy w bardziej płynną postać. Filamentom aktynowym mogą także towarzyszyć białka motoryczne tworząc pęczki skurczowe, jak to występuje w mięśniach. Filamenty mogą także służyć jako szlaki, wzdłuż których białka motoryczne transportują organelle; funkcja ta jest szczególnie widoczna w komórkach roślinnych.

W pozostałej części tego rozdziału omówimy niektóre charakterystyczne struktury, które mogą tworzyć filamenty aktynowe, i rozważymy, jak różne rodzaje białek wiążących się z aktyną są włączone w proces ich formowania się. Zaczniemy od bogatej w aktynę *kory komórki* i jej roli w poruszaniu się komórki, a następnie przejdziemy do rozważań na temat aparatu skurczowego komórek mięśniowych jako przykładu stabilnej struktury opartej na filamentach aktynowych.

Rys. 16-27. Główne klasy białek wiążących aktynę występujące w komórkach kręgowców. Aktynę przedstawiono kolorem *czerwonym,* a białka związane z aktyną kolorem *zielonym*



Bogata w aktynę kora komórki znajduje się pod błoną komórkową większości komórek eukariotycznych

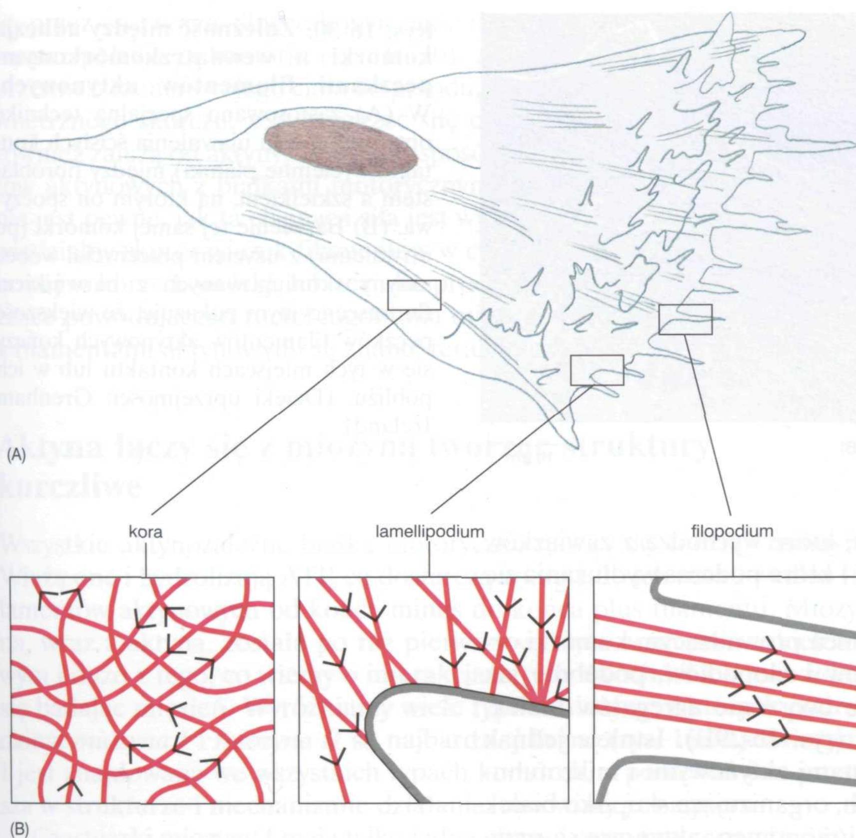
Jakkolwiek aktyna jest znajdowana w komórkach eukariotycznych w obrębie całej cytoplazmy, w większości komórek jest skoncentrowana w warstwie leżącej tuż pod błoną komórkową. W tym regionie, nazywanym **korą komórki**, filamenty aktynowe są powiązane przez białka łączące się z aktyną w sieć, która wspiera zewnętrzną powierzchnię komórki i nadaje jej mechaniczną wytrzymałość. W krwinkach czerwonych, jak opisano w rozdz. 11, prosta i regularna sieć włóknistych białek przyczepionych do błony komórkowej stanowi niezbędne podparcie pozwalające na zachowanie prostego dyskoidalnego kształtu (patrz rys. 11-31). W innych komórkach zwierzęcych kora komórki jest grubsza, bardziej złożona i wspiera daleko większy zakres kształtów i ruchów. Obok spektryny i ankiryny, kora komórki zawiera gęstą sieć filamentów aktynowych, które biegną do cytoplazmy, gdzie zostają poprzecznie powiązane w trójwymiarową sieć. Ta aktynowa sieć kory decyduje o kształcie i właściwościach mechanicznych błony komórkowej i powierzchni komórki. Jak zobaczymy, przetasowania aktyny w obrębie kory stanowią molekularną podstawę zmian kształtu komórki i jej ruchów.

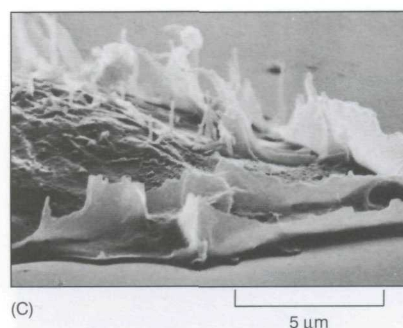
Pełzanie komórki zależy od aktyny

Wiele komórek porusza się raczej pełzając po powierzchniach niż pływając z użyciem rzęsek lub wici. Mięsożerne ameby pełzają nieustannie w poszukiwaniu pożywienia. Krwinki białe znane jako *granulocyty obojętnochłonne (neutrofile)* migrują z krwi do tkanek, gdzie „wyczuwają obecność" małych rozproszonych cząsteczek uwolnionych przez bakterie. Cząsteczki te są w końcu pochłaniane i niszczone przez neutrofile. Posuwający się do przodu wierzchołek rozwijającego się aksonu migruje w odpowiedzi na czynniki wzrostowe, postępując ścieżką określoną przez związane z podłożem i rozpuszczalne związki do ostatecznego celu, jakim jest synapsa.

Molekularne mechanizmy tych i innych form pełzania komórek są trudne do poddania szczegółowej analizie. Wymagają one skoordynowanych zmian wielu cząsteczek w różnych regionach komórki, a żadna pojedyncza, łatwa do zidentyfikowania organella lokomocyjna, jak np. wić, nie jest tu odpowiedzialna. Mówiąc ogólnie, trzy współzależne procesy są uważane za niezbędne: 1) komórka wysuwa wypustki ze swojego „przodu" lub części wiodącej; 2) wypustki te przywierają do powierzchni, po której komórka pełznie i 3) do takich miejsc zakotwiczenia jest podciągana pozostała część komórki, co przesuwa ją naprzód.

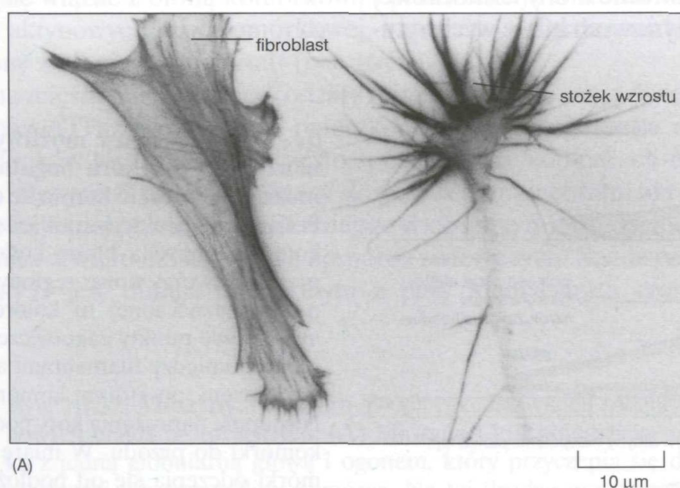
Wszystkie te trzy procesy wykorzystują aktynę, ale użyte sposoby są różne. Pierwszy etap — wypychania powierzchni komórki do przodu, jest kierowany przez polimeryzację aktyny. Prowadzący koniec pełzającego fibroblastu w hodowli regularnie wyciąga cienkie, blaszkowate **lamellipodia** (rys. 16-28), które zawierają gęstą, przestrzenną sieć filamentów aktynowych, zorientowanych w ten sposób, że większość filamentów ma swoje końce plus umiejscowione blisko błony komórkowej. Wiele komórek wysuwa także cienkie, sztywne wypustki zwane **filopodiami** (patrz rys. 16-28), zarówno na końcu prowadzącym, jak i gdziekolwiek na swojej powierzchni. Te wypustki mają szerokość ok. 0,1 μm oraz długość od 5 do 10 μm i każda z nich zawiera luźny pęczek 10–20 filamentów aktynowych, zorientowanych również w ten sposób, że ich końce plus są skierowane na zewnątrz. Posuwający się do przodu wierzchołek rozwijającego się akso-



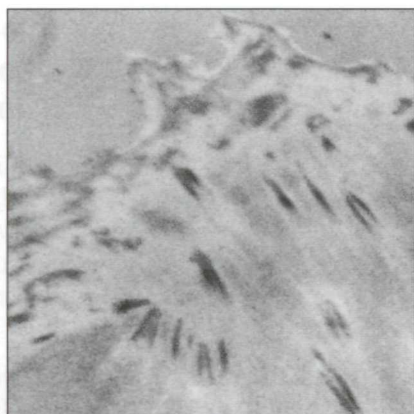


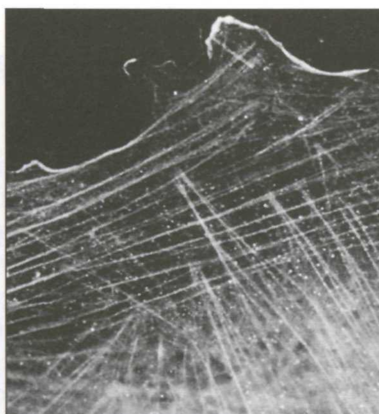
Rys. 16-28. Filamenty aktynowe w wędrującej komórce zwierzęcej. (A) Schematyczny rysunek fibroblastu pokazujący płytkowate lamellipodia i cienkie filopodia wystające z jego powierzchni, szczególnie w rejonie wiodącego końca. (B) Ukazano szczegóły aranżacji filamentów aktynowych w trzech regionach fibroblastu ze *strzałkami* wskazującymi kierunek plus filamentów. (C) Mikrografia elektronowa skaningowa przedstawiająca lamellipodia i filopodia na wiodącym końcu ludzkiego fibroblastu wędrującego w hodowli komórkowej. (C dzięki uprzejmości: Julian Heath)

nu komórki nerwowej wysuwa nawet dłuższe filopodia, do 50 μm długości, które ułatwiają wybadanie środowiska i odnalezienie właściwej ścieżki prowadzącej do celu (rys. 16-29A). Zarówno lamellipodia, jak i filopodia są poszukiwawczymi, ruchomymi strukturami, które tworzą się i zanikają z dużą szybkością. Uważa się, że struktury te powstają przez szybki



Rys. 16-29. Wzrost filopodiów. (A) Dwa różne typy komórek wybarwionych na obecność aktyny. Cienkie pęczki filamentów aktynowych w obrębie filopodiów są widoczne na wiodącym końcu zarówno spłaszczonych fibroblastów, jak i stożku wzrostu aksonu komórki nerwowej. (B) Na szczycie każdego filopodium mały agregat cząsteczek białkowych na wewnętrznej stronie błony komórkowej stanowi ośrodek nukleacji monomerów aktynowych dla filamentu. Wzrost filamentu aktynowego przemieszcza błonę komórkową na zewnątrz tworząc filopodium lub inną wypustkę komórkową. Dla uproszczenia pokazano tylko jeden filament aktynowy, natomiast większość wypustek na powierzchni komórki zawiera liczne filamenty aktynowe. (A dzięki uprzejmości: Peter J. Hollenbeck)



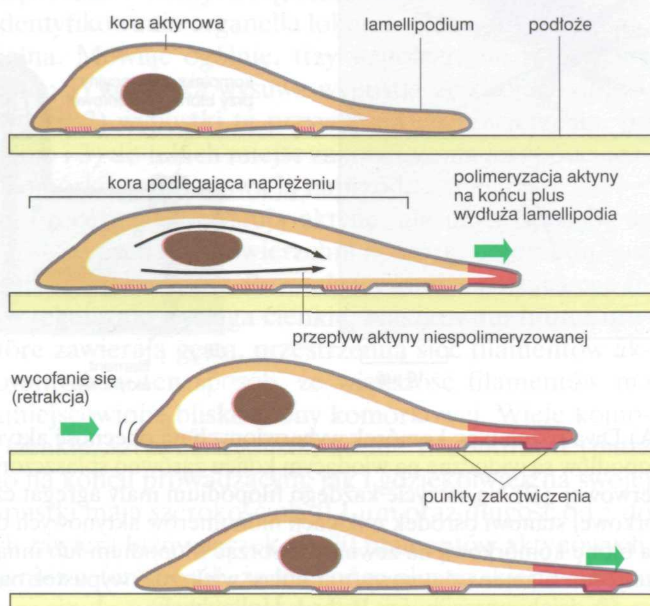


Rys. 16-30. Zależność między adhezją komórki a wewnątrzkomórkowymi pęczkami filamentów aktynowych. W (A) zastosowano specjalną technikę optyczną w celu ujawnienia ścisłych kontaktów (ciemne plamki) między fibroblastem a szkiełkiem, na którym on spoczywa. (B) Barwienie tej samej komórki (po utrwaleniu) z użyciem przeciwciał wobec aktyny skoniugowanych z barwnikiem fluorescencyjnym pokazuje, że większość pęczków filamentów aktynowych kończy się w tych miejscach kontaktu lub w ich pobliżu. (Dzięki uprzejmości: Grenham Ireland)

miejscowy wzrost filamentów aktynowych, które wychodzą z zawiązków umiejscowionych przy błonie komórkowej i które podczas wydłużania się rozciągają błonę bez jej rozrywania.

Wydaje się, że błona komórkowa na końcu prowadzącym komórki organizuje filamenty aktynowe lamellipodiów i filopodiów, podobnie jak centrosom organizuje mikrotubule, przez tworzenie agregatów białek, które rozpoczynają polimeryzację aktyny (rys. 16-29B). Istnieje jednak pewna zasadnicza różnica między filamentami aktynowymi i mikrotubulami. W przypadku filamentów aktynowych, organizujące skupisko białek jest usytuowane na końcu plus filamentu i monomery aktynowe są przyłączane do tego właśnie końca w celu wydłużenia filamentu. Wyjaśnienie, jak ten białkowy kompleks nukleacyjny funkcjonuje na poziomie molekularnym, pozostaje nadal tajemnicą.

Kiedy lamellipodia i filopodia dotkną wybranego skrawka powierzchni, przylegają do niego: białka transbłonowe w ich błonie komórkowej, znane jako *integryny*, przywierają do cząsteczek zawartych w macierzy międzykomórkowej lub na powierzchni innej komórki, nad którą poruszająca się komórka przepełza. W tym czasie po wewnętrznej stronie błony komórkowej integryny zapoczątkowują wzrost filamentów aktynowych lub je wychwytu-



Rys. 16-31. Jeden z możliwych modeli ukazujący, jak kora bogata w aktynę może przemieścić komórkę do przodu. Polimeryzacja aktyny na wiodącym końcu komórki popycha błonę komórkową do przodu i tworzy nowe regiony kory aktynowej, zaznaczonej tu kolorem *czerwonym*. Nowe punkty zakotwiczenia są tworzone pomiędzy filamentami aktynowymi i podłożem, po którym komórka pełznie. Następnie naprężenie kory podciąga ciało komórki do przodu. W miarę jak tył komórki odczepia się od podłoża i kurczy, filamenty aktynowe w kurczącym się regionie ulegają depolimeryzacji i uwolnione cząsteczki aktyny przesuwają się do przodu poprzez cytozol do miejsc nowej polimeryzacji. Ten sam cykl powtarza się na nowo, przemieszczając komórkę do przodu ruchem kroczącym

ją, przez co tworzą silne zakotwiczenie dla systemu tych filamentów wewnątrz pełzającej komórki (rys. 16-30). Aby użyć tego zakotwiczenia do przemieszczenia swojego ciała do przodu, komórka robi teraz użytek z wewnętrznego skurczu, żeby wywrzeć siłę ciągnącą (rys. 16-31). Te procesy również zależą od aktyny, ale w inny sposób — poprzez interakcję filamentów aktynowych z białkami motorycznymi znanymi jako *miozyny.* Nadal nie jest pewne, jak ta ciągnąca siła jest wytwarzana: może być za to odpowiedzialny skurcz wiązek filamentów w cytoplazmie lub skurcz sieci aktynowej w korze komórki, lub też oba procesy razem. Ogólne zasady dotyczące powodującego ruch reagowania miozynowych białek motorycznych z filamentami aktynowymi są znane; teraz to omówimy.

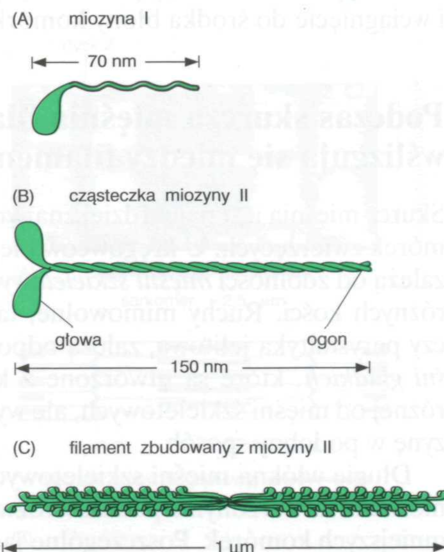
Pytanie 16-6. Na prowadzącym końcu pełzającej komórki końce plus filamentów aktynowych są przyczepione do błony komórkowej; monomery aktyny są do tego końca przyłączane i odpychają błonę na zewnątrz tworząc lamellipodia lub filopodia. Jak myślisz, co podtrzymuje filamenty aktynowe na ich odwrotnych końcach chroniąc je przed wepchnięciem do wnętrza komórki?

Aktyna łączy się z miozyną tworząc struktury kurczliwe

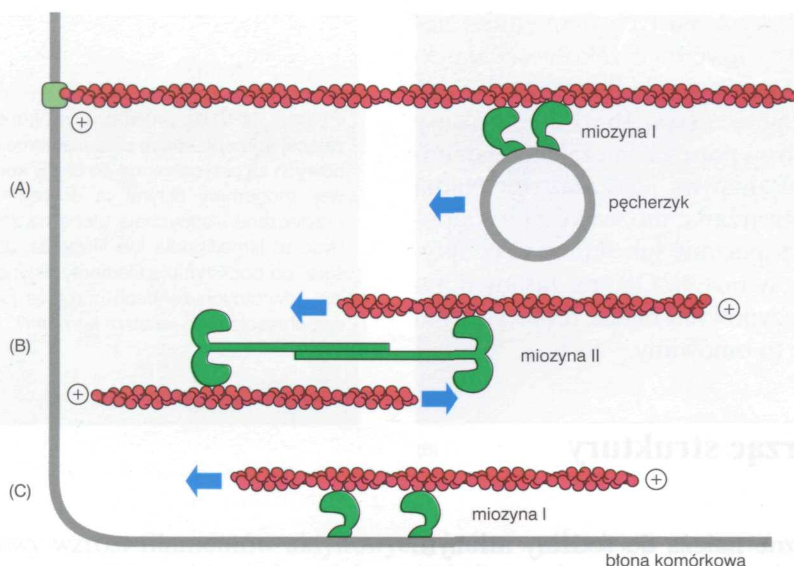
Wszystkie aktynozależne białka motoryczne należą do rodziny **miozyn**. Wiążą one i hydrolizują ATP, co dostarcza energię do ich ruchu wzdłuż filamentów aktynowych od końca minus do końca plus filamentu. Miozyna, wraz z aktyną, została po raz pierwszy wykryta w mięśniu szkieletowym i dużo z tego, co wiemy o interakcjach tych dwóch białek, nauczono się badając mięsień. Wyróżniamy wiele typów miozyny, z których podrodziny: *miozyna I* i *miozyna II* są najbardziej liczne (rys. 16-32). Miozyna I jest znajdowana we wszystkich typach komórek, a ponieważ jest prostsza w strukturze i mechanizmie działania, omówimy ją najpierw.

Cząsteczki miozyny I mają tylko jedną głowę i ogon (patrz rys. 16-32A). Domena głowy wchodzi w interakcję z filamentami aktynowymi i wykazuje opartą na hydrolizie ATP aktywność motoryczną, co umożliwia jej przemieszczanie się wzdłuż filamentu w cyklu: wiązanie, odłączenie i ponowne związanie. Ogon różni się w różnych typach miozyny I i określa, jakie składniki komórki będą transportowane przez ten motor. Na przykład ogon może wiązać szczególny rodzaj pęcherzyków błonowych i nadawać im ruch w komórce wzdłuż szlaków filamentów aktynowych (rys. 16-33A) lub może się wiązać z błoną komórkową i przesuwać ją w stosunku do filamentów aktynowych kory komórkowej, a przez to deformować lub rozciągać błonę zmieniając jej kształt (rys. 16-33C).

Miozyna mięśni należy do podrodziny miozyn II, które mają dwie głowy o aktywności ATPazowej i długie, pałeczkopodobne ogony (patrz rys. 16-32B). Członków tej podrodziny często spotyka się w komórkach niemięśniowych. Miozyna II tworzy struktury skurczowe z filamentami aktynowymi; są one najlepiej poznane i najliczniejsze w obrębie mięśni, ale pojawiają się również w wielu innych typach komórek zwierzęcych. Każda cząsteczka miozyny II jest dimerem złożonym z pary identycznych cząsteczek



Rys. 16-32. **Miozyny.** Pokazano dwóch przedstawicieli rodziny miozynowych białek motorycznych. (A) Miozyna I jest pojedynczą cząsteczką z jedną globularną głową i ogonem, który przyczepia się do innej cząsteczki lub organelli w komórce. Na tej drodze przyczepione cząsteczki czy organelle mogą być wleczone wzdłuż szlaków filamentów aktynowych dzięki motorycznej aktywności głów miozyny I. (B) Miozyna II jest zbudowana z pary identycznych cząsteczek miozynowych i stąd ma dwie globularne głowy i jeden ogon o konformacji superhelisy. (C) Ogony miozyny II mogą się łączyć ze sobą tworząc filament miozynowy, w którym głowy są skierowane na zewnątrz wzdłuż przebiegu filamentu. Odsłonięty region w środku filamentu składa się jedynie z ogonów



Rys. 16-33. Niektóre funkcje miozyny I i miozyny II w komórkach eukariotycznych. Krótki ogon cząsteczki miozyny I zawiera miejsca, które wiążą się z wieloma składnikami komórki, w tym z błonami. To pozwala domenie głowy przemieścić pęcherzyk po filamencie aktynowym (A) lub filament aktynowy w stosunku do błony komórkowej (C). Małe filamenty zbudowane z cząsteczek miozyny II mogą przesuwać filamenty aktynowe jeden nad drugim, co umożliwia lokalne *skracanie* pęczka filamentu aktynowego (B). Należy zauważyć, że w każdym zilustrowanym tu przypadku głowa miozyny kroczy w kierunku końca plus filamentu aktynowego, z którym się kontaktuje

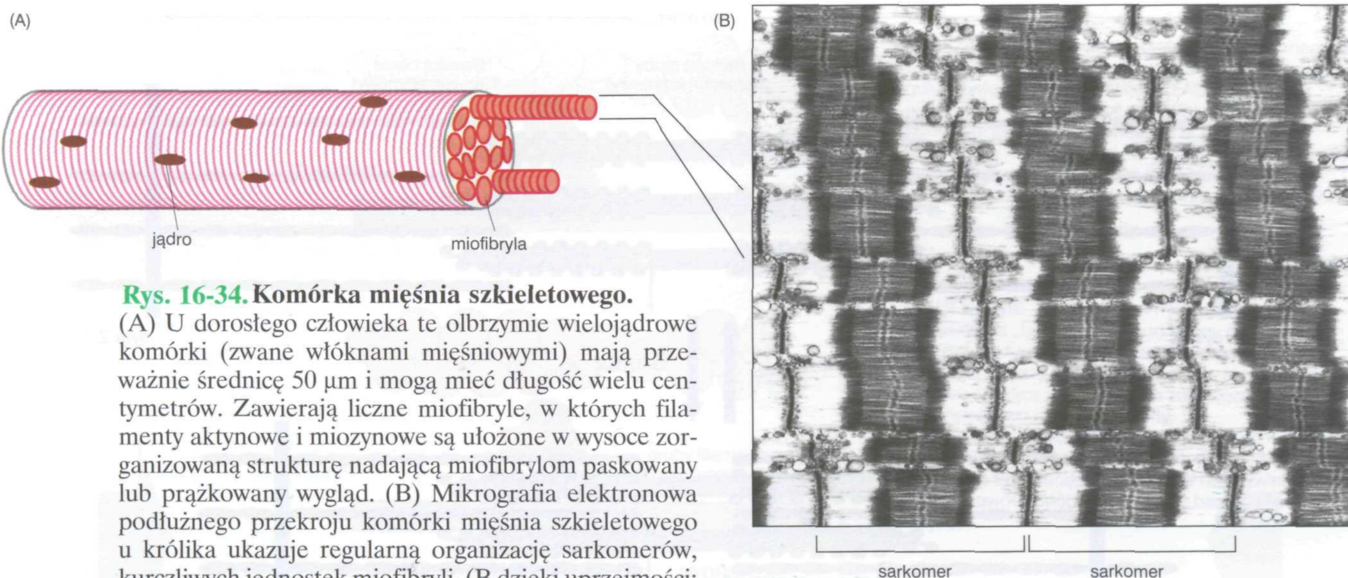
miozyny utrzymywanych razem poprzez ich ogony; ma ona dwie kuliste głowy o aktywności ATPazy na jednym końcu i pojedynczy ogon w kształcie superhelisy na drugim końcu (patrz rys. 16-32B). Skupienia cząsteczek miozyny II wiążą się jedne z drugimi poprzez ich ogony, tworząc filament miozynowy, w którym głowy wystają na zewnątrz (patrz rys. 16-32C).

Filament miozynowy jest spolaryzowany, podobnie jak strzała o dwóch grotach, z dwoma zestawami głów skierowanymi w przeciwnych kierunkach, na zewnątrz od środka. Jeden zestaw głów wiąże filamenty aktynowe w jednej orientacji i przesuwa je w jedną stronę; inny zestaw głów wiąże się z innymi filamentami aktynowymi o przeciwnej orientacji i przesuwa je w drugą stronę. Całkowity efekt polega na nasuwaniu się na siebie zestawów przeciwnie skierowanych filamentów aktynowych (rys. 16-33B). Możemy więc zrozumieć, w jaki sposób zorganizowany pęczek filamentów aktynowych i miozynowych może generować siłę skurczową. Jest to najbardziej wyraźne w skurczu mięśnia (omówionym później), ale także ujawnia się w obrębie *pęczków skurczowych* złożonych z filamentów aktynowych i filamentów miozyny II (patrz rys. 16-24B), które formują się przejściowo w komórkach niemięśniowych, a również w *pierścieniach skurczowych*, rozdzielających dzielącą się komórkę na dwie przez skurcz i wciągnięcie do środka błony komórkowej (co omówiono w rozdz. 17).

Podczas skurczu mięśnia filamenty aktynowe wślizgują się między filamenty miozynowe

Skurcz mięśnia jest najbardziej znanym i rozumianym rodzajem ruchu komórek zwierzęcych. U kręgowców bieganie, chodzenie, pływanie i latanie zależą od zdolności *mięśni szkieletowych* do silnych skurczów i poruszania różnych kości. Ruchy mimowolne, takie jak pompujące działanie serca czy perystaltyka jelitowa, zależą odpowiednio od *mięśni sercowych* i *mięśni gładkich*, które są utworzone z komórek mięśniowych o strukturze różnej od mięśni szkieletowych, ale wykorzystują do skurczu aktynę i miozynę w podobny sposób.

Długie włókna mięśni szkieletowych są olbrzymimi, pojedynczymi komórkami utworzonymi podczas rozwoju przez fuzję wielu oddzielnych, mniejszych komórek. Poszczególne jądra połączonych komórek są zacho-

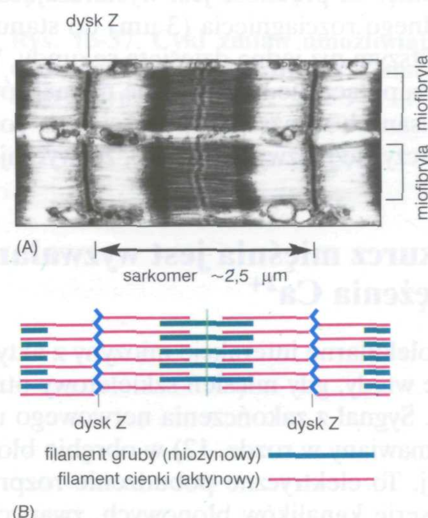


Rys. 16-34. Komórka mięśnia szkieletowego. (A) U dorosłego człowieka te olbrzymie wielojądrowe komórki (zwane włóknami mięśniowymi) mają przeważnie średnicę 50 μm i mogą mieć długość wielu centymetrów. Zawierają liczne miofibryle, w których filamenty aktynowe i miozynowe są ułożone w wysoce zorganizowaną strukturę nadającą miofibrylom paskowany lub prążkowany wygląd. (B) Mikrografia elektronowa podłużnego przekroju komórki mięśnia szkieletowego u królika ukazuje regularną organizację sarkomerów, kurczliwych jednostek miofibryli. (B dzięki uprzejmości: Roger Craig)

wane we włóknie mięśniowym i leżą tuż pod błoną komórkową. Ogromną większość cytoplazmy zajmują **miofibryle,** kurczliwe elementy komórki mięśniowej. Te cylindryczne struktury mają średnicę 1–2 μm i mogą być tak długie, jak długa jest sama komórka mięśniowa (rys. 16-34A).

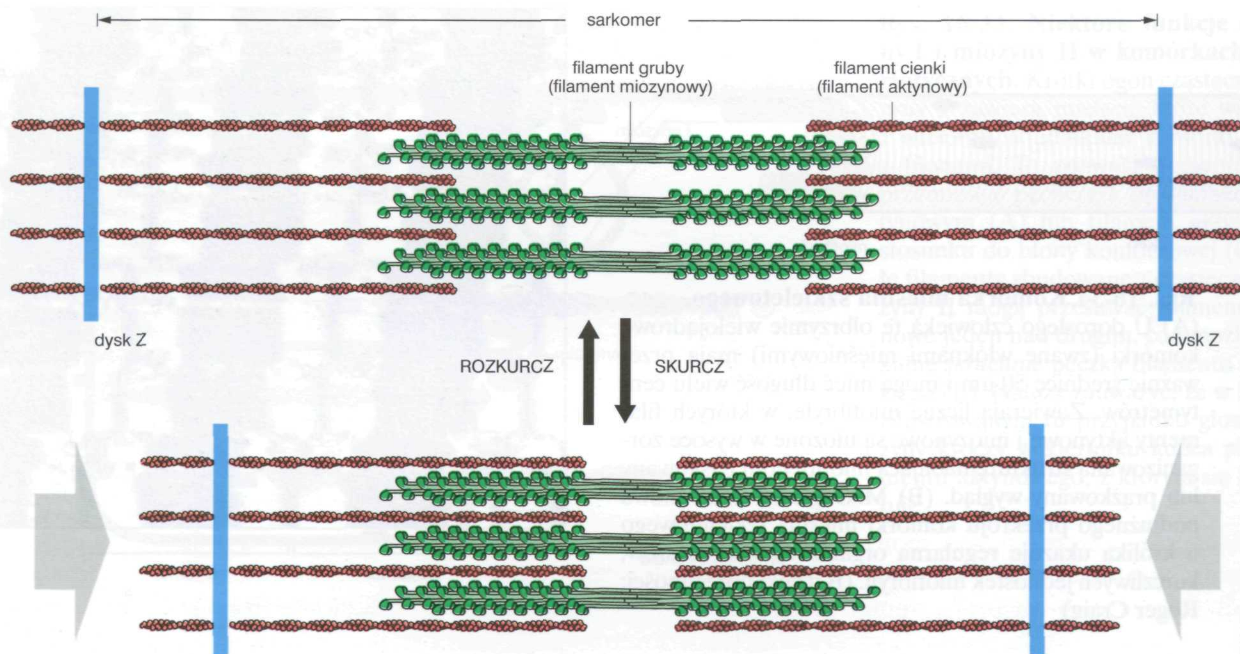
Miofibryla zawiera łańcuch identycznych małych jednostek kurczliwych, czyli **sarkomerów.** Każdy sarkomer ma długość ok. 2,5 μm, a regularne ich ułożenie w łańcuch nadaje miofibrylom kręgowców paskowany lub prążkowany wygląd (rys. 16-34B). Sarkomery są wysoce zorganizowanymi układami składającymi się z dwóch typów filamentów — filamentów aktynowych i filamentów specyficznej dla mięśni miozyny II. Filamenty miozynowe (*filamenty grube*) są w każdym sarkomerze położone centralnie, natomiast cieńsze filamenty aktynowe (*filamenty cienkie*) rozciągają się do wewnątrz z każdego końca sarkomeru (gdzie są zakotwiczone swoim końcem plus do struktury znanej jako *dysk Z** i zachodzą na końce filamentów miozynowych (rys. 16-35).

Skurcz komórki mięśniowej jest spowodowany jednoczesnym skróceniem się wszystkich sarkomerów, co jest wywołane ślizganiem się filamentów aktynowych po filamentach miozynowych bez zmiany długości obu typów filamentów (rys. 16-36). Ruch ślizgowy jest wywoływany przez głowy miozyny, które wystają z brzegów filamentu miozynowego i wchodzą w interakcję z przylegającymi filamentami aktynowymi. Kiedy następuje



Rys. 16-35. Sarkomery. (A) Wycinek komórki mięśnia szkieletowego przedstawionej na poprzednim rysunku, ukazujący dwie miofibryle, z zaznaczonym zasięgiem dwóch sarkomerów. (B) Schematyczny diagram pojedynczego sarkomeru ukazujący pochodzenie jasnych i ciemnych prążków, widziany w mikroskopie. Dyski Z na każdym końcu sarkomeru są punktami zaczepu dla filamentów aktynowych; centralnie położone filamenty grube są zbudowane z wielu cząsteczek miozyny II. (A dzięki uprzejmości: Roger Craig)

* Dotychczas strukturę tę określano w języku polskim jako *linia Z*, co wynikało z jej wyglądu w mikroskopie świetlnym. Z powodów dydaktycznych będziemy używać nazwy *dysk Z* jako bardziej oddającej istotę tej struktury oraz zgodnej z tekstem angielskim (*przyp. tłum.*).



Rys. 16-36. Model ślizgowy skurczu mięśnia. (A) Filamenty miozynowe i aktynowe sarkomeru zachodzą na siebie zachowując względną polarność po każdej stronie linii środkowej. Przypomnij sobie, że filamenty aktynowe są zakotwiczone swoimi końcami plus w dyskach Z i że filamenty miozynowe są dwubiegunowe. (B) Podczas skurczu filamenty aktynowe i miozynowe ślizgają się względem siebie bez skracania się. Ruch ślizgowy jest napędzany przez głowy miozyny kroczące w kierunku końca plus przylegającego filamentu aktynowego

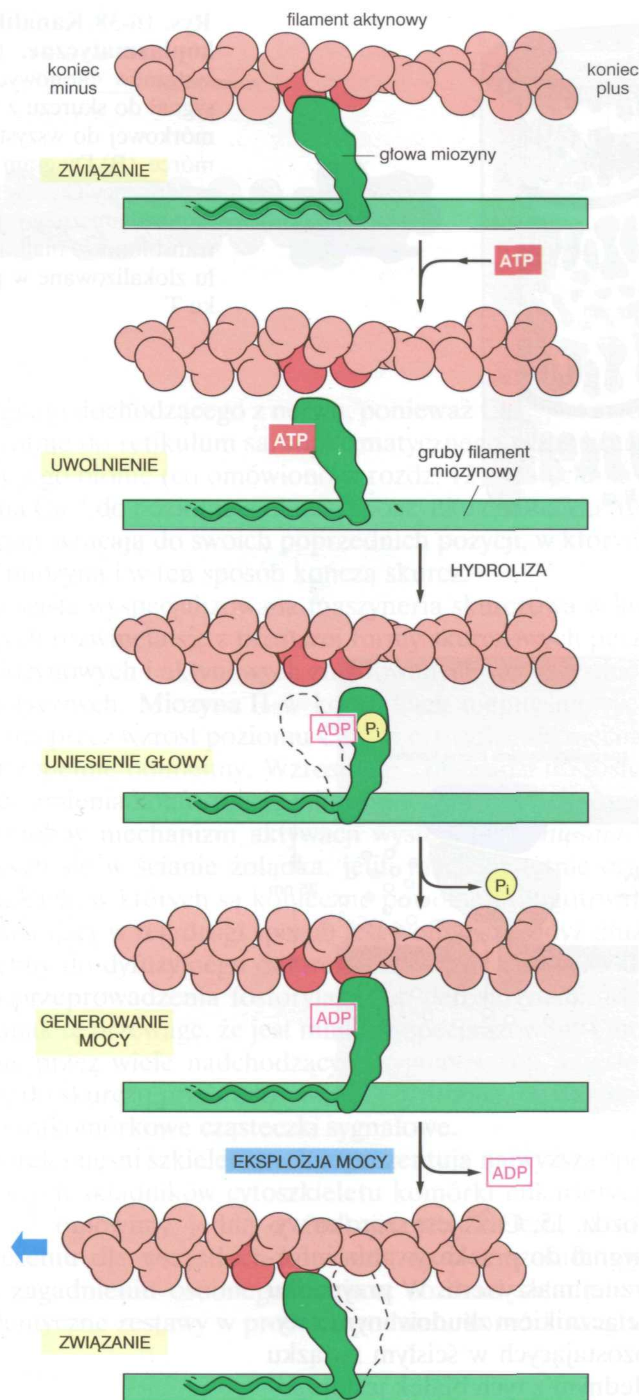
stymulacja mięśnia do wykonania skurczu, głowy miozyny zaczynają wędrować wzdłuż filamentu aktynowego w powtarzających się cyklach przyczepiania się i odczepiania się; ich połączone działanie przesuwa filamenty aktynowe i miozynowe względem siebie powodując skurcz sarkomeru. Kiedy skurcz jest zakończony, głowy miozyny tracą całkowicie kontakt z filamentami aktynowymi i mięsień relaksuje się.

Podczas każdego cyklu przyłączania i odłączania miozyna wiąże i hydrolizuje jedną cząsteczkę ATP. Przypuszcza się, że jest to przyczyna serii zmian konformacyjnych w cząsteczce miozyny, która przesuwa końcówkę głowy o ok. 5 nm wzdłuż filamentu aktynowego w kierunku końca plus. Ten ruch, powtarzany w każdym cyklu hydrolizy ATP, nadaje jednokierunkowy ruch cząsteczce miozyny wzdłuż filamentu aktynowego (rys. 16-37). W ten sposób głowy miozyny posuwają się wzdłuż filamentu aktynowego powodując, że ten ostatni ślizga się po filamencie miozynowym. Każdy filament miozynowy ma ok. 300 głów miozynowych; każda głowa może wykonać ok. pięciu cykli na sekundę, powodując ślizganie się filamentów miozynowych i aktynowych względem siebie z prędkością do 15 μm na sekundę. Ta prędkość jest wystarczająca do przejścia sarkomeru ze stanu pełnego rozciągnięcia (3 μm) do stanu pełnego skurczu (2 μm) w czasie krótszym niż jedna dziesiąta sekundy. Wszystkie sarkomery mięśnia są ze sobą połączone i pobudzane niemal równocześnie przez system sygnałów opisanych w następnej części tego rozdziału. Dlatego też cały mięsień kurczy się niezwykle szybko, zazwyczaj w ciągu jednej dziesiątej sekundy.

Pytanie 16-7. Porównaj strukturę filamentów pośrednich do struktury filamentów miozyny II w mięśniach szkieletowych. Jakie są główne podobieństwa i różnice? W jaki sposób różnice w strukturze są powiązane z funkcją tych filamentów?

Skurcz mięśnia jest wyzwalany przez nagły wzrost stężenia Ca^{2+}

Molekularne interakcje miozyny z aktyną generujące siłę występują jedynie wtedy, gdy mięsień szkieletowy otrzymuje sygnał z układu nerwowego. Sygnał z zakończenia nerwowego uruchamia potencjał czynnościowy (omawiany w rozdz. 12) w obrębie błony komórkowej komórki mięśniowej. To elektryczne pobudzenie rozprzestrzenia się w ciągu milisekund w serię kanalików błonowych, zwanych *kanalikami poprzecznymi*, które



ZWIĄZANIE – Na początku cyklu przedstawionego na tym rysunku głowa miozyny nie mająca związanego nukleotydu jest ściśle złączona z filamentem aktynowym w konfiguracji *sztywnej* (nazwanej tak, ponieważ jest ona odpowiedzialna za stężenie pośmiertne – *rigor mortis*). W aktywnie kurczącym się mięśniu ten stan jest bardzo krótkotrwały i szybko kończy się przyłączeniem cząsteczki ATP.

UWOLNIENIE – Cząsteczka ATP wiąże się z dużą szczeliną na „tyle" głowy (tj. od strony najdalszej od filamentu aktynowego) i natychmiast powoduje niewielką zmianę konformacji domen, które tworzą miejsce wiążące dla aktyny. To zmniejsza powinowactwo głowy do aktyny i pozwala jej poruszać się wzdłuż filamentu. (Przestrzeń narysowana tu między głową i aktyną uwydatnia tę zmianę, aczkolwiek w rzeczywistości głowa prawdopodobnie pozostaje bardzo blisko aktyny).

UNIESIENIE GŁOWY – Szczelina zamyka się jak muszla małża wokół cząsteczki ATP wywołując dużą zmianę kształtu, która powoduje, że głowa zostaje przemieszczona wzdłuż filamentu na odległość ok. 5 nm. Zachodzi hydroliza ATP, ale powstające ADP i P_i pozostają ściśle związane z białkiem.

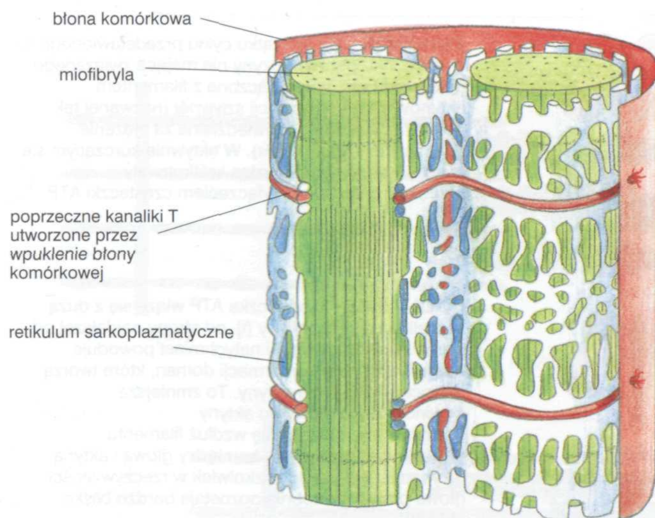
GENEROWANIE MOCY – Słabe związanie głowy miozyny z nowym miejscem na filamencie aktynowym powoduje uwolnienie fosforanu nieorganicznego powstałego w drodze hydrolizy ATP, czemu towarzyszy ściśle związanie głowy do aktyny. To wyzwala eksplozję mocy, czyli generującą siłę zmiany kształtu, podczas której głowa odzyskuje swoją pierwotną konformację. W czasie eksplozji mocy głowa traci związany z nią ADP wracając przez to na początek nowego cyklu.

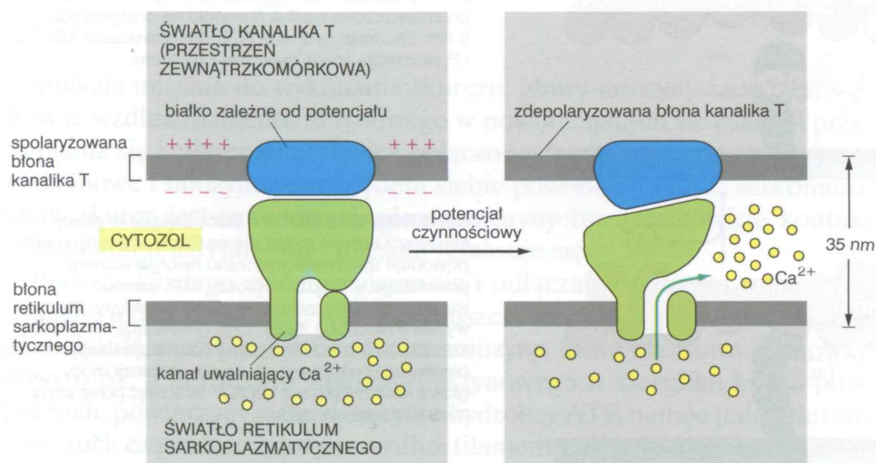
ZWIĄZANIE – Na końcu cyklu głowa miozyny jest ponownie ściśle związana z filamentem aktynowym w sztywnej konfiguracji. Zauważ, że głowa przemieściła się na nową pozycję na filamencie aktynowym.

Rys. 16-37. Cykl zmian umożliwiających wędrówkę miozyny po filamentach aktynowych

sięgają od błony komórkowej do wnętrza komórki, do powierzchni każdej miofibryli. Sygnał elektryczny jest następnie przenoszony do *retikulum sarkoplazmatycznego*, płaskiej strefy zbudowanej z połączonych wewnątrz, spłaszczonych pęcherzyków, która otacza każdą miofibrylę jak siateczkowa pończocha (rys. 16-38A).

Retikulum sarkoplazmatyczne jest wyspecjalizowanym regionem retikulum endoplazmatycznego w komórkach mięśniowych. Zawiera ono Ca^{2+} w bardzo dużym stężeniu; w odpowiedzi na dochodzące pobudzenie elektryczne większość tego Ca^{2+} zostaje uwolniona do cytozolu poprzez kanały jonowe, które otwierają się w błonie retikulum sarkoplazmatycznego w odpowiedzi na zmiany transbłonowego potencjału błony komór-

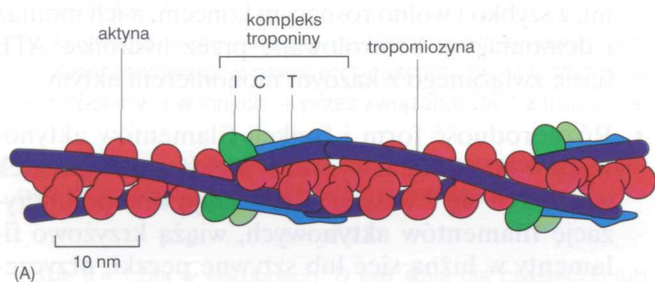


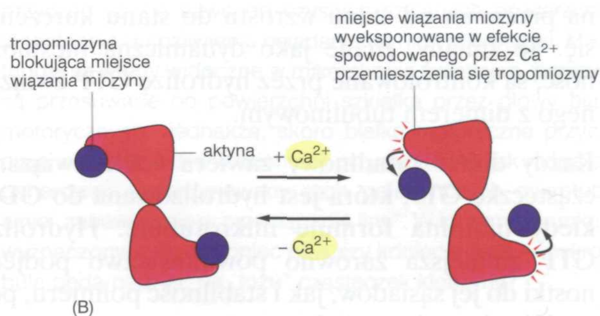


Rys. 16-38. Kanaliki T i retikulum sarkoplazmatyczne. (A) Rysunek dwóch systemów błonowych, które przekazują sygnał do skurczu z mięśniowej błony komórkowej do wszystkich miofibryli w komórce. (B) Diagram pokazujący, jak kanał uwalniający Ca^{2+} w błonie retikulum sarkoplazmatycznego jest otwierany przez transbłonowe białko zależne od potencjału zlokalizowane w przylegającym kanaliku T

kowej (rys. 16-38B). Jak omówiono to w rozdz. 15, Ca^{2+} jest szeroko wykorzystywany jako wewnątrzkomórkowy sygnał do przekazywania informacji z otoczenia komórki do jej wewnętrznej maszynerii. W przypadku mięśnia, Ca^{2+} reaguje z molekularnym przełącznikiem zbudowanym z wyspecjalizowanych białek dodatkowych, pozostających w ścisłym związku z filamentami aktynowymi (rys. 16-39A). Jednym z tych białek jest *tropomiozyna,* sztywna, pałeczkowata cząsteczka, która wiążąc się z bruzdą helisy aktyny i pokrywając siedem monomerów aktynowych, zapobiega wiązaniu się główek miozynowych z filamentem aktynowym. Innym białkiem jest *troponina,* kompleks białkowy, który zawiera białko wrażliwe na Ca^{2+} (*troponina C*), towarzyszące końcówce cząsteczki tropomiozyny. Kiedy poziom Ca^{2+} w cytozolu rośnie, Ca^{2+} wiąże się z troponiną i indukuje zmianę jej kształtu. To z kolei powoduje, że cząsteczki tropomiozyny zmieniają nieco swoją pozycję, pozwalając głowom miozyny związać się z filamentem aktynowym i zapoczątkować skurcz (rys. 16-39B).

Ponieważ sygnał z błony komórkowej jest przenoszony w ciągu milisekund (poprzez kanaliki poprzeczne i retikulum sarkoplazmatyczne) do każdego sarkomeru w komórce, wszystkie miofibryle w komórce kurczą się w tym samym czasie. Zwiększenie stężenia Ca^{2+} w cytozolu kończy się





Rys. 16-39. Kontrola skurczu mięśnia szkieletowego przez troponinę. (A) Cienki filament mięśniowy ukazujący pozycje tropomiozyny i troponiny na filamencie aktynowym. Każda cząsteczka tropomiozyny ma siedem równo rozmieszczonych regionów homologicznych sekwencji, które, jak się sądzi, mogą się wiązać z monomerami aktyny, jak to pokazano na rysunku. (B) Cienki filament przestawiono w przekroju poprzecznym, aby zilustrować sposób, w jaki przemieszczenie tropomiozyny — wywołane związaniem Ca^{2+} z troponiną — uwalnia aktynę i umożliwia jej oddziaływanie z głowami miozyny

zaraz po ustaniu sygnału dochodzącego z nerwu, ponieważ Ca^{2+} jest szybko pompowany zwrotnie do retikulum sarkoplazmatycznego przez liczne pompy wapniowe w jego błonie (co omówiono w rozdz. 12). Natychmiast po powrocie stężenia Ca^{2+} do poziomu z okresu spoczynku cząsteczki troponiny i tropomiozyny wracają do swoich poprzednich pozycji, w których blokują wiązanie z miozyną i w ten sposób kończą skurcz.

Uważa się, że ta ściśle wyspecjalizowana maszyneria skurczowa w komórkach mięśniowych rozwinęła się z prostszej formy skurczowych pęczków filamentów miozynowych i aktynowych znajdowanych we wszystkich komórkach eukariotycznych. Miozyna II w komórkach niemięśniowych jest także aktywowana przez wzrost poziomu Ca^{2+} w cytozolu, ale mechanizm aktywacji jest zupełnie odmienny. Wzrost Ca^{2+} prowadzi do fosforylacji miozyny II, co zmienia konformację miozyny i umożliwia jej reagowanie z aktyną. Podobny mechanizm aktywacji występuje w *mięśniach gładkich,* znajdujących się w ścianie żołądka, jelit, macicy i tętnic oraz w wielu innych tkankach, w których są konieczne powolne i długotrwałe skurcze. Skurcz powstający w ten drugi sposób jest wolniejszy, gdyż dłuższy czas jest potrzebny do dyfuzyjnego dotarcia cząsteczek enzymów do głów miozyny i do przeprowadzenia fosforylacji lub defosforylacji. Mechanizm ten ma jednak tę przewagę, że jest mniej wyspecjalizowany i może być uruchamiany przez wiele nadchodzących sygnałów: np. mięsień gładki jest włączany do skurczu przez adrenalinę, serotoninę, prostaglandyny i różne inne pozakomórkowe cząsteczki sygnałowe.

Sarkomery komórek mięśni szkieletowych reprezentują najwyższą specjalizację podstawowych składników cytoszkieletu komórki eukariotycznej. W rozdziale 17 omówimy jedną z funkcji cytoszkieletu, o tak podstawowym znaczeniu dla wszystkich komórek, że jest uzasadnione poświęcenie temu zagadnieniu osobnego miejsca: rozdział składników komórki na dwa identyczne zestawy w procesie podziału komórkowego.

Pytanie 16-8

A. Przypomnij sobie z rys. 16-39, że cząsteczki troponiny są równo rozmieszczone wzdłuż filamentu aktyny z jedną troponiną umieszczoną przy każdej siódmej cząsteczce aktyny. Jak sądzisz, dlaczego cząsteczki troponiny są tak regularnie rozmieszczone? Co ci to mówi o wiązaniu troponiny z filamentami aktynowymi?

B. Jak myślisz, co mogłoby się stać, jeśli zmieszałbyś filamenty aktynowe z: a) samą troponiną, b) samą tropomiozyną lub c) z troponiną i tropomiozyną, a następnie dodał miozynę? Czy efekt byłby zależny od Ca^{2+}?

Streszczenie

- Cytoplazma komórki eukariotycznej jest wsparta i przestrzennie zorganizowana przez cytoszkielet z filamentów pośrednich, mikrotubul i filamentów aktynowych.
- Filamenty pośrednie są stabilnymi, linopodobnymi polimerami włóknistych białek, które nadają komórkom mechaniczną wytrzymałość. Niektóre ich typy wspierają otoczkę jądrową tworząc blaszkę jądrową, inne są rozproszone w całej cytoplazmie.
- Mikrotubule są sztywnymi, wydrążonymi rurkami utworzonymi przez polimeryzację dimerowych podjednostek tubuliny. Są one strukturami spolaryzowanymi z wolniej rosnącym końcem „minus" i szybciej rosnącym końcem „plus".
- Mikrotubule ulegają nukleacji w ośrodkach organizacyjnych takich jak centrosom i z nich wyrastają. Końce minus mikrotubul są osadzone w centrum organizacyjnym.
- Wiele mikrotubul w komórce znajduje się w labilnym stanie dynamicznym, w którym przechodzą one

na przemian od stanu wzrostu do stanu kurczenia się. Te zmiany, znane jako dynamiczna niestabilność, są kontrolowane przez hydrolizę GTP związanego z dimerem tubulinowym.

- Każdy dimer tubulinowy zawiera ściśle związaną cząsteczkę GTP, która jest hydrolizowana do GDP, kiedy tubulina formuje mikrotubulę. Hydroliza GTP zmniejsza zarówno powinowactwo podjednostki do jej sąsiadów, jak i stabilność polimeru, powodując jego demontaż.
- Mikrotubule mogą być stabilizowane przez białka, które łączą się z końcem plus — proces wpływający na położenie układów mikrotubul w komórce. Komórki zawierają wiele białek towarzyszących mikrotubulom, które stabilizują mikrotubule, wiążą je z innymi składnikami komórki i wykorzystują do specyficznych funkcji.
- Kinezyny i dyneiny są białkami motorycznymi, które spożytkowują energię z hydrolizy ATP, aby poruszać się wzdłuż mikrotubul. Niosą one specyficzne pęcherzyki błonowe oraz inne rodzaje cargo (ładunku) i w ten sposób utrzymują przestrzenną organizację cytoplazmy.
- Eukariotyczne rzęski i wici zawierają pęczek stabilnych mikrotubul. Ich uderzanie jest spowodowane uginaniem się mikrotubul, kierowanym przez białko motoryczne zwane dyneiną rzęskową.
- Filamenty aktynowe są helikalnymi polimerami cząsteczek aktyny. Są one bardziej giętkie aniżeli mikrotubule i często są znajdowane w pęczkach lub sieciach towarzyszących błonie komórkowej.
- Filamenty aktynowe są strukturami spolaryzowanymi, z szybko i wolno rosnącym końcem, a ich montaż i demontaż są kontrolowane przez hydrolizę ATP ściśle związanego z każdym monomerem aktyny.
- Różnorodność form i funkcji filamentów aktynowych w komórkach wynika z wielości typów białek wiążących się z aktyną. Kontrolują one polimeryzację filamentów aktynowych, wiążą krzyżowo filamenty w luźną sieć lub sztywne pęczki, przyczepiają je do błon lub przemieszczają je względem siebie.
- Miozyny są białkami motorycznymi, które wykorzystują energię hydrolizy ATP do przesuwania się wzdłuż filamentów aktynowych; mogą przenosić organelle wzdłuż szlaków filamentów aktynowych lub powodować, że przylegające do siebie filamenty ślizgają się jeden po drugim w pęczkach skurczowych.
- Sieć filamentów aktynowych pod błoną komórkową tworzy korę komórki, która jest odpowiedzialna za kształt i ruch powierzchni komórkowej, łącznie z ruchami występującymi wtedy, gdy komórka pełznie po powierzchni.
- Skurcz mięśnia zależy od ślizgania się filamentów aktynowych wzdłuż filamentów miozyny II i jest napędzany powtarzającym się przemieszczaniem głów miozyny.
- Skurcz jest inicjowany przez nagły wzrost zawartości Ca^{2+} w cytozolu, który stanowi — poprzez białka wiążące Ca^{2+} — sygnał dla aparatu skurczowego.

Hasła

białko motoryczne	dynamiczna niestabilność	kinezyna	miozyna
blaszka jądrowa	dyneina	kora komórki	rzęska
centriola	filament aktynowy	lamellipodium	sarkomer
centrosom	filament pośredni	mikrotubula	tubulina
cytoszkielet	filopodium	miofibryla	wić

Pytania

Pytanie16-9. Które z następujących twierdzeń jest prawdziwe? Wyjaśnij odpowiedź.

A. Kinezyna przemieszcza błony retikulum endoplazmatycznego wzdłuż mikrotubul w taki sposób, że sieć ER rozciąga się poprzez całą komórkę.

B. Bez aktyny komórki mogą utworzyć funkcjonalne wrzeciono mitotyczne i rozdzielić swoje chromosomy, ale nie mogą się podzielić.

C. Lamellipodia i filopodia są „mackami", które komórka wysuwa, aby znaleźć punkt uchwytu na podłożu i następnie nad nim przepełznąć.

D. GTP jest hydrolizowany przez tubulinę w celu ugięcia wici.

E. Komórka, która miałaby sieć złożoną z filamentów pośrednich, nie mogących depolimeryzować, musiałaby umrzeć.

F. Koniec plus mikrotubuli rośnie szybciej, ponieważ zawiera większą czapeczkę zbudowaną z GTP.

G. Kanaliki poprzeczne w komórkach mięśniowych są wypustką błony komórkowej i podobnie retikulum sarko-

plazmatyczne jest przedłużeniem retikulum endoplazmatycznego.

H. Aktywacja ruchu miozyny na filamencie aktynowym jest zapoczątkowana w pewnych sytuacjach przez fosforylację troponiny, a w innych — przez związanie Ca^{2+} z troponiną.

Pytanie 16-10. Średni czas potrzebny cząsteczce lub organelli do przebycia odległości w cm przedstawia wzór:

$$t = x^2/2D$$

gdzie t = czas w sekundach, D jest stałą dla cząsteczki lub cząstki, zwaną współczynnikiem dyfuzji. Używając podanego wzoru, oblicz czas, który może zabrać małej cząsteczce, białku i pęcherzykowi błonowemu dyfuzyjne przemieszczenie się w obrębie komórki na odległość 10 μm. Typowymi wartościami współczynnika dyfuzji (wyrażonymi w jednostkach cm^2/s) są: dla małych cząsteczek — $5 \cdot 10^{-6}$; dla cząsteczki białka — $5 \cdot 10^{-7}$ i dla pęcherzyka — $5 \cdot 10^{-8}$. Jak dużo czasu zabierze pęcherzykowi błonowemu osiągnięcie zakończenia aksonu o długości 10 cm w drodze wolnej dyfuzji?

Pytanie 16-11. Zestaw różnice między komórkami bakterii i zwierząt, które mogłyby zależeć od pojawienia się w trakcie ewolucji niektórych lub wszystkich składników obecnego eukariotycznego cytoszkieletu. Wyjaśnij, dlaczego cytoszkielet mógł być przełomowym czynnikiem powstania tych różnic.

Pytanie 16-12. Przyjrzyj się strukturze pośredniego filamentu pokazanej na rys. 16-4. Czy filament ten ma wyjątkową polarność — tzn., czy mógłbyś odróżnić jeden koniec od drugiego w sensie chemicznym lub innym? Wyjaśnij odpowiedź.

Pytanie 16-13. Nie znamy żadnych białek motorycznych, które poruszałyby się na filamentach pośrednich. Zaproponuj wyjaśnienie.

Pytanie 16-14. Gdy komórki wchodzą w stadium mitozy, układ ich mikrotubul cytoplazmatycznych musi raptownie rozpaść się i być zastąpiony przez wrzeciono mitotyczne, które formuje się, aby rozdzielić chromosomy do komórek potomnych. Enzym katanina, nazwany tak od mieczy samurajów japońskich, uaktywniający się na początku mitozy, tnie mikrotubule na drobne kawałki. Jaki według ciebie jest los tak powstałych fragmentów mikrotubul wytworzonych przez kataninę? Wyjaśnij odpowiedź.

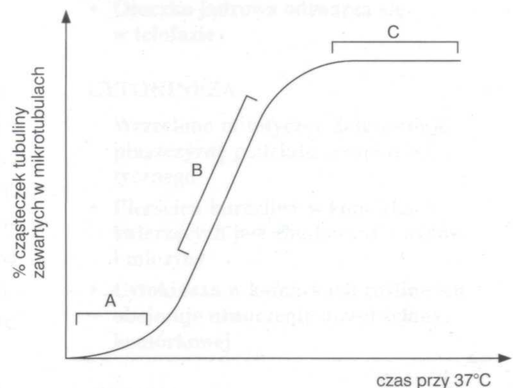
Pytanie 16-15. Lek taksol otrzymywany z kory cisu wywiera odwrotne działanie niż kolchicyna, alkaloid krokusa jesiennego. Taksol wiąże się silnie z mikrotubulami i stabilizuje je; dodany do komórek powoduje, że wiele wolnych tubulin formuje mikrotubule. Dla odróżnienia, kolchicyna zapobiega formowaniu mikrotubul. Taksol jest równie szkodliwy dla dzielących się komórek jak kolchicyna i obie substancje są stosowane jako leki przeciwnowotworowe. Bazując na swojej wiedzy o dynamice mikrotubul zasugeruj, dlaczego oba leki są toksyczne dla dzielących się komórek, mimo ich przeciwstawnego działania.

Pytanie 16-16. Użyteczną techniką do badania mikrotubulowych motorów jest przyczepianie ich ogonami do szkiełek nakrywkowych (co może być osiągnięte z łatwością, gdyż ogony przyczepiają się łatwo do czystych szklanych powierzchni), a następnie umożliwienie osiadania na nich mikrotubul. Mikrotubule są wtedy widoczne w mikroskopie świetlnym, ponieważ są przesuwane po powierzchni szkiełka przez głowy białek motorycznych. Jednakże, skoro białka motoryczne przyczepiają się do szkiełka w orientacji przypadkowej, jak mogą one generować skoordynowany ruch pojedynczych mikrotubul, a nie „zabawiać się w przeciąganie liny". W którym kierunku — wyznaczonym przez koniec plus czy koniec minus — mikrotubule będą pełznąć na „łożu" cząsteczek kinezyny?

Pytanie 16-17. Typowy przebieg polimeryzacji oczyszczonej tubuliny prowadzący do sformowania mikrotubul jako funkcji czasu pokazano na rys. P16-17.

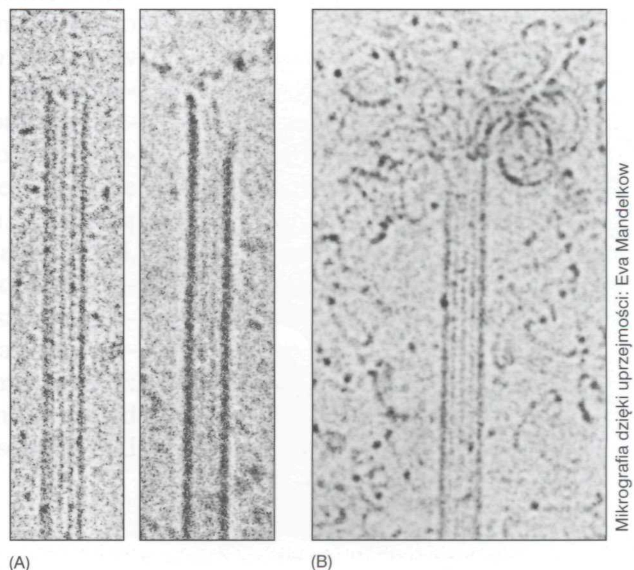
A. Objaśnij różne części krzywej (oznaczone jako A, B i C). Narysuj diagram, który obrazuje zachowanie się cząsteczek tubuliny w każdej z trzech faz.

B. Jak mogłaby się zmienić krzywa na rysunku, jeśli od samego początku dodano by centrosomy?



Rys. P16-17

Pytanie 16-18. Mikrografia elektronowa pokazana na rys. P16-18A została otrzymana z populacji mikrotubul, które rosły bardzo gwałtownie. Na rys. P16-18B przedstawiono mikrotu-



Rys. P16-18

bule ulegające „katastrofalnemu” skracaniu się. Skomentuj różnice między tymi dwoma obrazami i zasugeruj prawdopodobne ich wyjaśnienie.

Pytanie 16-19. Ruch fibroblastów w hodowli jest natychmiast zatrzymywany przez lek cytochalazynę, natomiast kolchicyna powoduje, że fibroblasty przestają się poruszać w danym kierunku i zaczynają wysuwać lamellipodia w przypadkowych kierunkach. Iniekcja do fibroblastów przeciwciał przeciwko wimentynie nie wpływa zauważalnie na ich migrację. Co sugerują te obserwacje o udziale trzech różnych cytoszkieletowych filamentów w ruchu fibroblastów?

Pytanie 16-20. Uzupełnij następujące zdanie w sposób właściwy, wyjaśniając powód twojej akceptacji lub odrzucenia każdej z czterech fraz. Rolą wapnia w skurczu mięśnia jest..

A. odłączenie głowy miozyny od aktyny.

B. rozszerzenie potencjału czynnościowego z błony komórkowej na maszynerię kurczliwą.

C. przyłączenie się do troponiny, co spowoduje przemieszczenie tropomiozyny, a następnie wystawienie filamentów aktynowych na działanie głów miozyny.

D. utrzymanie struktury filamentu miozynowego.

Pytanie 16-21. Które z następujących zmian zachodzą, gdy kurczy się mięsień szkieletowy?

A. Dyski Z odsuwają się dalej od siebie.

B. Filamenty aktynowe kurczą się.

C. Filamenty miozynowe kurczą się.

D. Sarkomery skracają się.

17
Podział komórki

CYKL KOMÓRKOWY W ZARYSIE

- **Eukariotyczny cykl komórkowy jest podzielony na cztery fazy**
- **Cytoszkielet przeprowadza zarówno mitozę, jak i cytokinezę**
- **Niektóre organelle ulegają fragmentacji w czasie mitozy**

MITOZA

- **Wrzeciono mitotyczne zaczyna być montowane w profazie**
- **Chromosomy przymocowują się do wrzeciona mitotycznego w prometafazie**
- **W metafazie chromosomy ustawiają się w płaszczyźnie równikowej wrzeciona**
- **Siostrzane chromosomy rozdzielają się w anafazie**
- **Otoczka jądrowa odtwarza się w telofazie**

CYTOKINEZA

- **Wrzeciono mitotyczne determinuje płaszczyznę podziału cytoplazmatycznego**
- **Pierścień kurczliwy w komórkach zwierzęcych jest zbudowany z aktyny i miozyny**
- **Cytokineza w komórkach roślinnych obejmuje utworzenie nowej ściany komórkowej**

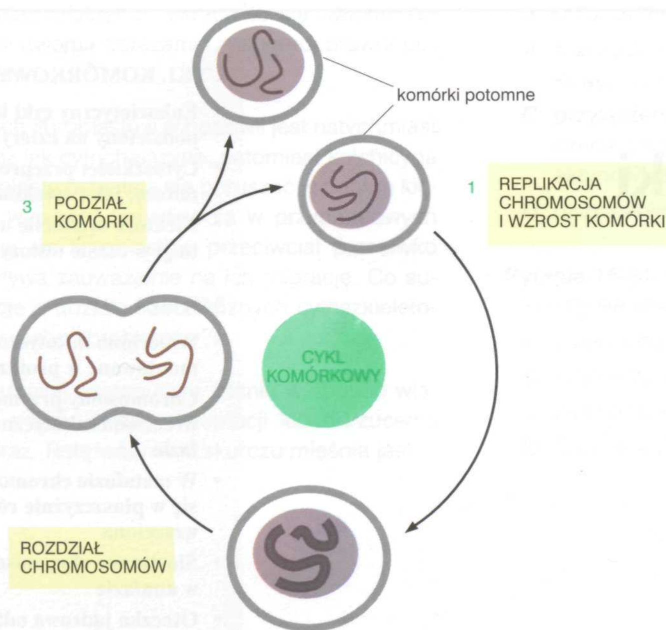
MEJOZA

- **Homologiczne chromosomy łączą się w pary w czasie mejozy**
- **Mejoza obejmuje dwa podziały komórkowe, a nie jeden**

„Tam gdzie powstaje komórka, musi istnieć komórka poprzednia, tak samo jak zwierzęta mogą powstawać tylko ze zwierząt, a rośliny z roślin". Ta *doktryna komórkowa*, zaproponowana przez niemieckiego patologa Rudolfa Virchowa w 1858 roku, niesie głębokie przesłanie o ciągłości życia. Komórki rodzą się z komórek, a jedynym sposobem na pomnożenie komórek jest podział tych, które już istnieją. Wszystkie żywe organizmy, od jednokomórkowych bakterii do wielokomórkowych ssaków, są produktami cyklicznych aktów wzrostu i podziału komórek, które powtarzają się nieprzerwanie od początków życia przed ponad trzema miliardami lat.

Komórka rozmnaża się przechodząc uporządkowaną sekwencję zdarzeń, w trakcie których najpierw podwaja swoją zawartość, a następnie dzieli się na dwie nowe komórki. Ten cykl obejmujący replikację i podział, nazywany **cyklem komórkowym**, jest podstawowym mechanizmem wykorzystywanym przez wszystkie żywe istoty do rozmnażania. U organizmów jednokomórkowych, takich jak bakterie lub drożdże, każdy podział komórki tworzy całkowicie nowy organizm, natomiast u organizmów wielokomórkowych do zbudowania nowego osobnika z jednokomórkowego jaja jest potrzebnych wiele cykli podziałowych. U licznych organizmów wielokomórkowych podziały komórkowe zachodzą przez całe życie. Niezbędne są one nawet u postaci dojrzałych, stale bowiem jest konieczne zastępowanie tych komórek, które obumarły. Na przykład u dorosłego człowieka tylko niektóre komórki, jak nerwowe i mięśniowe, nie dzielą się w ogóle*, a większość innych komórek ciągle ulega podziałom. Zachodzą one jednak z bardzo różną szybkością: komórki wątroby, na przykład, dzielą się mniej więcej raz na rok, natomiast komórki nabłonka wyścielającego jelito, a także liczne prekursorowe komórki krwinek w szpiku kostnym dzielą się częściej niż raz na dzień. Faktycznie, każdy z nas musi wytworzyć miliony komórek w każdej sekundzie, by po prostu móc istnieć: jeśli wszystkie podziały komórkowe zostaną zatrzymane — na przykład poprzez napromieniowanie dużą dawką promieni X — osobnik taki umrze w ciągu kilku dni.

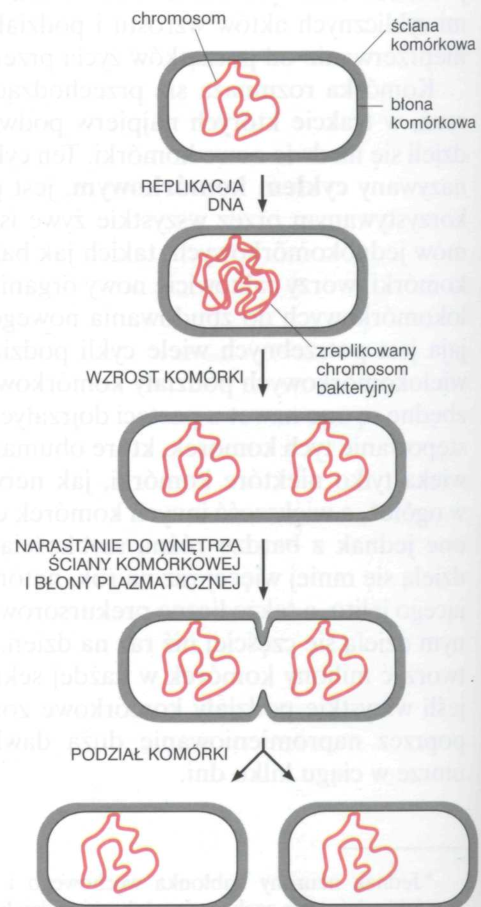
*Jednak neurony nabłonka węchowego i opuszki węchowej, a także satelitarne komórki mięśniowe zachowują zdolność podziału przez całe życie człowieka (*przyp. tłum.*).



Rys. 17-1. Cykl komórkowy. Przedstawiono podział hipotetycznej komórki eukariotycznej o dwóch chromosomach, aby pokazać, jak w każdym cyklu powstają dwie genetycznie identyczne komórki potomne

Poszczególne organizmy różnią się szczegółami cyklu komórkowego, a co więcej szczegóły te są różne w odmiennych okresach życia organizmu. Pewne cechy są jednak uniwersalne, bowiem cykl ten powinien się składać przynajmniej z tych procesów, które muszą być wykonane przez komórkę w celu spełnienia najbardziej podstawowego zadania — skopiowania i przekazania swojej informacji genetycznej do następnego pokolenia komórek. Aby wytworzyć dwie genetycznie identyczne komórki potomne, DNA w każdym chromosomie musi zostać wiernie zreplikowany, a następnie zreplikowane chromosomy muszą być dokładnie rozdzielone do dwóch komórek potomnych. W ten sposób każda komórka otrzymuje kopię kompletnego genomu (rys. 17-1). W większości przypadków w każdym cyklu komórkowym komórki podwajają swoją masę; w przeciwnym razie stawałyby się coraz mniejsze po każdym podziale, co zdarza się niekiedy we wczesnych stadiach embrionalnych, o czym powiemy w dalszej części rozdziału.

Najprostszy i najszybszy podział komórki występuje u bakterii, które nie mają jądra komórkowego, lecz jedynie pojedynczy chromosom. Na przykład cały cykl komórkowy u *Escherichia coli* zabiera w sprzyjających warunkach zaledwie 20 minut. Jej pojedynczy, kolisty chromosom, zawierający jedną cząsteczkę DNA, jest przyczepiony do błony plazmatycznej i trwa tak podczas replikacji. Powstałe dwa nowe chromosomy odsuwają się od siebie w trakcie wzrostu komórki. Gdy komórka mniej więcej podwoi swoje rozmiary, rozmnaża się przez podział. Proces ten jest zwany *prostym podziałem komórkowym*, w którym dwie oddzielne komórki potomne powstają jedynie przez odłożenie nowej ściany komórkowej i nowej błony plazmatycznej między dwoma chromosomami (rys. 17-2).



Rys. 17-2. Podział komórkowy u bakterii. Bakteryjny chromosom, zawierający pojedynczą cząsteczkę kolistego DNA, jest przyczepiony do błony plazmatycznej i pozostaje tam w czasie replikacji i po jej ukończeniu. Dwie nowe cząsteczki DNA zostają rozdzielone przez wzrost komórki. Ściana komórkowa i błona plazmatyczna rosną do wnętrza pomiędzy tymi cząsteczkami, w ten prosty sposób dzieląc komórkę na dwie potomne. W bakteryjnej komórce nie ma organelli, toteż ten sposób podziału zapewnia wszystko, co jest niezbędne do równego rozdziału materiału genetycznego i cytoplazmy między dwie komórki potomne

Podziały komórkowe komórek eukariotycznych, nawet u jednokomórkowych eukariotów, takich jak drożdże i ameby, są znacznie bardziej skomplikowane, między innymi dlatego, że główna informacja genetyczna komórki — jej genom jądrowy — jest rozmieszczona w licznych chromosomach. (Przypomnijmy, że komórka eukariotyczna zawiera niewielką ilość DNA także w swych mitochondriach, oraz jeśli jest komórką roślinną, również w chloroplastach.) W komórce eukariotycznej znajduje się ponadto skomplikowany zespół organelli cytoplazmatycznych, a także filamenty cytoszkieletu, i wszystkie one muszą zostać podwojone i rozdzielone między dwie komórki potomne. Dlatego też w trakcie eukariotycznego cyklu komórkowego złożone procesy cytoplazmatyczne muszą być koordynowane z równie złożonymi procesami jądrowymi.

Aby wyjaśnić, jak rozmnażają się komórki, musimy rozważyć trzy podstawowe zagadnienia: 1. Jak komórki podwajają swoją zawartość? 2. Jak rozdzielają podwojoną zawartość do dwóch komórek potomnych? 3. Jak koordynują cały mechanizm, niezbędny do tych dwóch procesów, w taki sposób, aby na przykład nie doszło do podziału, zanim proces podwajania nie zostanie ukończony? Pierwszy problem jest omawiany w innych miejscach książki. W rozdziale 6 przedstawiono, jak replikuje się DNA, a w rozdziałach 7, 11, 14 i 16 opisano, jak eukariotyczna komórka wytwarza inne składniki, takie jak białka, błony, organelle i filamenty cytoszkieletu. W tym rozdziale zajmiemy się drugim problemem — fizycznym procesem podziału komórki. Zachodzi on przede wszystkim dzięki pracy cytoszkieletu, który przepycha i odciąga zreplikowane składniki do dwóch oddzielnych zestawów i dzieli komórkę na dwie. W rozdziale 18 omówimy trzeci i najbardziej trudny problem — jak komórka eukariotyczna koordynuje różne etapy jej cyklu reprodukcyjnego.

Większa część obecnego rozdziału jest poświęcona zdarzeniom, które zachodzą w czasie podziału jądra komórkowego (*mitozy*) i cytoplazmy (*cytokinezy*) w typowej komórce eukariotycznej. W końcowej części rozdziału krótko przedstawimy odpowiadające im zdarzenia, zachodzące w czasie *mejozy*, wyspecjalizowanego typu podziału komórkowego, w którym, jak to przedstawiono w rozdz. 9, z diploidalnych komórek prekursorowych powstają haploidalne gamety — u zwierząt plemniki i jaja. Aby przygotować podstawę do naszych rozważań o podziale komórkowym, zaczniemy od krótkiego naszkicowania zdarzeń zachodzących w typowym cyklu komórkowym u zwierząt.

Cykl komórkowy w zarysie

Czas trwania cyklu komórkowego różni komórki odmiennych typów. Jednokomórkowe drożdże w idealnych warunkach mogą dzielić się co 90–120 minut, natomiast komórka wątrobowa ssaków dzieli się przeciętnie rzadziej niż raz na rok (tab. 17-1). Tu omówimy sekwencję zdarzeń w stosunkowo szybko dzielącej się komórce zwierzęcej, której cykl komórkowy trwa ok. 24 godzin.

Eukariotyczny cykl komórkowy jest podzielony na cztery fazy

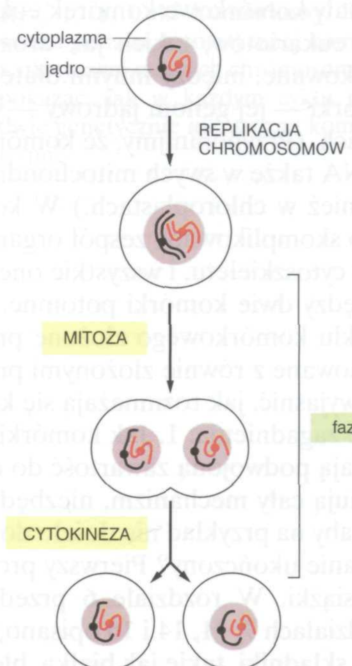
Eukariotyczny cykl komórkowy tradycyjnie dzieli się na cztery stadia lub *fazy*. Jeśli będziemy go śledzić pod mikroskopem, wśród kolejno obserwowanych wydarzeń dwa najbardziej istotne to: pierwsze, gdy dzieli się jądro

Tabela 17-1. Czas trwania niektórych eukariotycznych cykli komórkowych

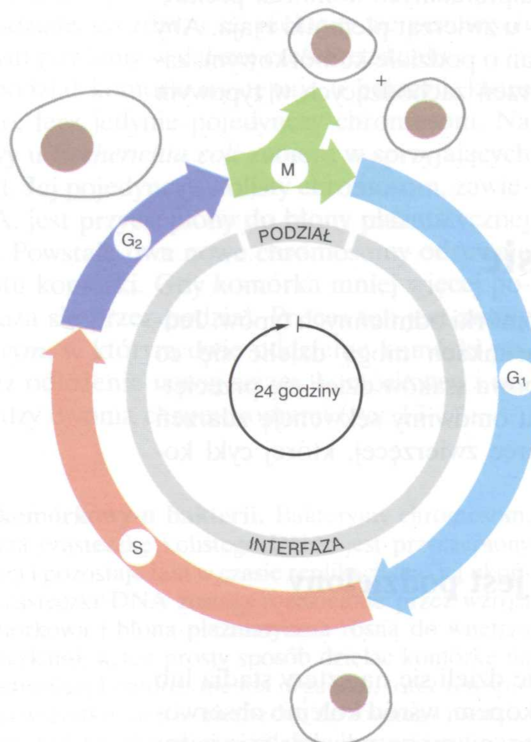
Typ komórki	Czas cyklu komórkowego
Komórki wczesnych embrionów żaby	30 minut
Komórki drożdży	1,5–3 godzin
Komórki nabłonka jelita	~12 godzin
Fibroblasty ssaków w hodowli	~20 godzin
Komórki wątrobowe człowieka	~1 rok

komórkowe, w procesie zwanym *mitozą*, i drugie, kiedy to komórka dzieli się na dwie, co nazywamy *cytokinezą*. Te dwa procesy tworzą razem **fazę M** cyklu komórkowego (rys. 17-3). W typowej komórce ssaków cała faza M trwa mniej więcej jedną godzinę, co stanowi jedynie małą część czasu, w którym zachodzi cały cykl komórkowy.

Okres między jedną fazą M a następną jest nazywany **interfazą**. Pod mikroskopem złudnie wydaje się ona nie zakłócanym żadnymi zdarzeniami okresem przejściowym, w czasie którego komórka po prostu zwiększa swoje rozmiary. Jednakże interfaza jest bardzo pracochłonnym okresem dla komórki i jest dzielona na trzy pozostałe fazy cyklu komórkowego. W czasie **fazy S** (S = synteza) komórka replikuje swój jądrowy DNA, spełniając podstawowy warunek wstępny podziału komórkowego. Fazie S po obu krańcach towarzyszą fazy, w czasie których komórka wzrasta. **Faza G_1** (G = ang. gap, przerwa) jest okresem między ukończeniem fazy M a początkiem fazy S (syntezy DNA). **Faza G_2** jest okresem między końcem fazy S a początkiem kolejnej fazy M (rys. 17-4). Jak omówiono w rozdz. 18, w określonym momencie faz G_1 i G_2 komórka podejmuje decyzję, czy przystępować do następnej fazy, czy też zrobić przerwę, by zyskać czas na przygotowania.



Rys. 17-3. Faza M cyklu komórkowego. Faza M obejmuje podział jądra komórkowego (mitozę), po którym następuje podział cytoplazmy (cytokineza)

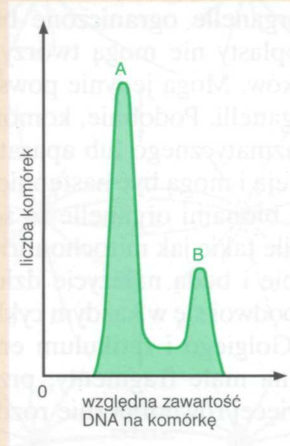


Rys. 17-4. Cztery kolejne fazy standardowego eukariotycznego cyklu komórkowego. W czasie interfazy komórka rośnie w sposób ciągły. Podczas fazy M wzrost zostaje zatrzymany i dochodzi do podziału najpierw jądra komórkowego, a następnie całej komórki. Replikacja DNA jest ograniczona tylko do części interfazy, znanej jako faza S. Faza G_1 jest przerwą (ang. gap) między fazami M a S. Natomiast faza G_2 to przerwa między fazą S a fazą M

W ciągu całej interfazy komórka dokonuje transkrypcji genów, syntetyzuje białka i zwiększa swoją masę. Obie fazy, G_1 i G_2, zapewniają komórce dodatkowy czas do wzrostu i zreplikowania jej cytoplazmatycznych organelli: jeśli interfaza trwałaby tylko tak długo, jak wymaga tego replikacja DNA, komórka nie miałaby czasu na podwojenie swojej masy przed podziałem i w konsekwencji stawałaby się po każdym podziale coraz mniejsza. W pewnych szczególnych okolicznościach to zdarza się rzeczywiście. Na przykład u niektórych embrionów zwierzęcych pierwsze podziały komórkowe po zapłodnieniu (zwane bruzdkowaniem) służą podzieleniu olbrzymiej komórki jajowej na wiele mniejszych komórek tak szybko, jak tylko jest to możliwe. W tych cyklach komórkowych komórki nie rosną przed podziałem, a ich fazy G_1 i G_2 są drastycznie skrócone.

Pierwszym łatwo zauważalnym objawem, że komórka ma właśnie wejść w fazę M, jest progresywna *kondensacja* jej chromosomów, które zostały wcześniej zreplikowane w czasie fazy S (obie kopie każdego chromosomu są jednak nadal ściśle ze sobą związane). Kondensacja chromosomów wyznacza koniec fazy G_2. W tym stadium cyklu komórkowego chromosomy stają się widoczne w mikroskopie świetlnym początkowo jako długie nici, które następnie stopniowo robią się krótsze i grubsze w procesie upakowywania, opisanym w rozdz. 8. Ta kondensacja powoduje, że zmniejsza się prawdopodobieństwo splątania chromosomów ze sobą i dlatego są one fizycznie łatwiejsze do rozdzielenia w czasie mitozy.

Pytanie 17-1. Komórki populacji w czasie wzrostu wybarwiono znacznikiem, który stawał się fluoryzujący po związaniu z DNA, przy czym fluorescencja jest wprost proporcjonalna do ilości DNA w komórce. Aby zmierzyć ilość DNA w każdej komórce, komórki przepuszczano następnie poprzez fluorescencyjny sortownik komórkowy (ang. fluorescence-activated cell sorter), przyrząd, który rejestruje poziom fluorescencji w pojedynczych komórkach. Liczbę komórek o określonej zawartości DNA przedstawiono graficznie (rys. P17-1). Zaznacz na wykresie, gdzie można oczekiwać znalezienia komórek, które są w następujących fazach cyklu komórkowego: G_1, S, G_2 i M. Która z faz cyklu komórkowego jest najdłuższa w tej populacji komórek?



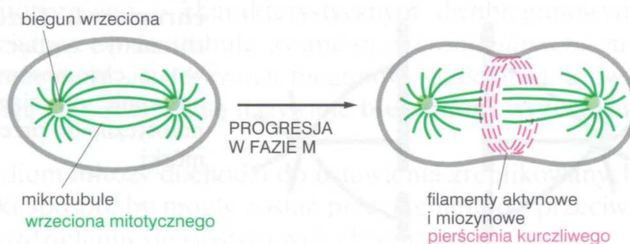
Rys. P17-1

Cytoszkielet przeprowadza zarówno mitozę, jak i cytokinezę

W tym samym czasie, gdy zreplikowane chromosomy ulegają kondensacji, są montowane kolejno dwie oddzielne struktury cytoszkieletu, które mają za zadanie przeprowadzić dwa mechaniczne procesy zachodzące w fazie M — podział jądra komórkowego (mitozę) i podział cytoplazmy (cytokinezę). Obie struktury są szybko rozmontowywane zaraz po tym, jak wykonają swoją pracę.

Aby wytworzyć dwie genetycznie identyczne komórki potomne, komórka eukariotyczna musi wykonać precyzyjną pracę rozdzielenia zreplikowanych chromosomów i umieszczenia jednej kopii każdego z nich w każdej komórce potomnej. To zadanie zostaje zrealizowane w czasie mitozy i jest przeprowadzane przez *wrzeciono mitotyczne*, które jest zbudowane głównie z mikrotubul (ich budowę omówiono w rozdz. 16). Wrzeciono mitotyczne zaczyna być montowane w późnej fazie G_2. Zbudowane z mikrotubul wrzeciono mitotyczne pośredniczy w mitozie we wszystkich komórkach eukariotycznych, zarówno roślin i zwierząt, jak i jednokomórkowych grzybów (np. drożdży).

Druga struktura cytoszkieletowa montowana w fazie M jest odpowiedzialna za cytokinezę. W odróżnieniu od wrzeciona powstaje ona tylko w komórkach zwierzęcych. Zwana jest *pierścieniem kurczliwym*, ponieważ składa się głównie z kurczliwego pierścienia filamentów aktynowych



Rys. 17-5. Dwie przejściowe struktury cytoszkieletu, za których pośrednictwem zachodzi faza M w komórkach zwierząt. Jako pierwsze zostaje sformowane wrzeciono mitotyczne, które rozdziela chromosomy. Następnie jest formowany pierścień kurczliwy z zadaniem podziału jednej komórki na dwie

i miozynowych (których budowę omówiono w rozdz. 16). Montaż pierścienia zaczyna się pod koniec mitozy wokół równika komórki, tuż pod błoną komórkową. Gdy pierścień ulega skurczowi, wciąga błonę do środka i w ten sposób dzieli komórkę na dwie (rys. 17-5). W dalszej części omówimy, jak komórki roślinne dzielą cytoplazmę stosując zupełnie odmienny mechanizm, pozwalający przezwyciężyć problem, jaki stwarza posiadana przez nie ściana komórkowa.

Niektóre organelle ulegają fragmentacji w czasie mitozy

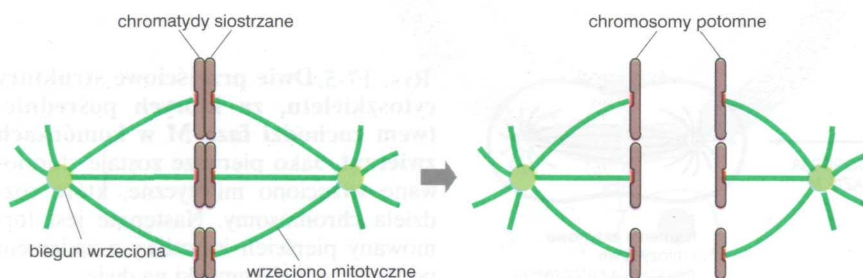
Proces mitozy zapewnia, że każda komórka potomna otrzymuje pełen zestaw chromosomów. Każda potomna komórka eukariotyczna musi również odziedziczyć wszystkie inne podstawowe składniki komórki, w tym także organelle ograniczone błoną. Organelle takie jak mitochondria i chloroplasty nie mogą tworzyć się spontanicznie z ich elementarnych składników. Mogą jedynie powstawać przez wzrost i podział już istniejących organelli. Podobnie, komórka nie może stworzyć nowego retikulum endoplazmatycznego lub aparatu Golgiego, chyba że niektóre ich części już istnieją i mogą być następnie rozbudowane. Jak zatem te różne, ograniczone błonami organelle są segregowane w czasie podziału komórki? Organelle takie jak mitochondria lub chloroplasty są zwykle obecne w dużej liczbie i będą należycie dziedziczone, jeśli przeciętnie ich liczba po prostu podwoi się w każdym cyklu komórkowym. Inne organelle, takie jak aparat Golgiego i retikulum endoplazmatyczne, rozpadają się w czasie mitozy na małe fragmenty, przez co zwiększają się szanse, że zostaną mniej więcej równomiernie rozdzielone między komórki potomne.

Pytanie 17-2. W czasie cyklu komórkowego aparat Golgiego jest rozdzielany między komórki potomne poprzez przypadkową dystrybucję jego fragmentów, które powstają podczas mitozy. Wyjaśnij, dlaczego chromosomy nie mogą być rozdzielane przypadkowo do komórek potomnych?

Mitoza

Przed podziałem jądra komórkowego, a więc przed **mitozą**, każdy chromosom został zreplikowany (jak omówiono w rozdz. 8) i składa się z dwóch identycznych **chromatyd** (zwanych *chromatydami siostrzanymi*), które są połączone razem na całej długości dzięki interakcjom białek znajdujących się na powierzchni każdej z nich. W czasie mitozy białka te są rozszczepiane, w wyniku czego chromatydy siostrzane oddzielają się od siebie i stają się niezależnymi chromosomami potomnymi. Są one przeciągane do przeciwległych biegunów komórki przez wrzeciono mitotyczne (rys. 17-6).

Mitoza stanowi nieprzerwaną sekwencję zdarzeń. Tradycyjnie dzieli się ją jednak na pięć stadiów: 1) w czasie *profazy* zreplikowane chromosomy ulegają kondensacji, a poza obszarem jądra komórkowego rozpoczyna się montowanie wrzeciona mitotycznego; 2) w czasie *prometafazy* otoczka



Rys. 17-6. Rozdzielenie siostrzanych chromatyd. Każda para siostrzanych chromatyd zostaje rozdzielona i tak powstają chromosomy potomne, które są następnie przeciągane przez wrzeciono mitotyczne do przeciwnych biegunów komórki

jądrowa rozpada się, co umożliwia mikrotubulom wrzeciona kontakt z chromosomami i związanie się z nimi; 3) w czasie *metafazy* wrzeciono mitotyczne gromadzi wszystkie chromosomy w centralnej (równikowej) części wrzeciona; 4) w czasie *anafazy* dwie chromatydy siostrzane w każdym zreplikowanym chromosomie synchronicznie oddzielają się od siebie i wrzeciono zaciąga je do przeciwnych biegunów komórki (patrz rys. 17-6); 5) w czasie *telofazy* otoczka jądrowa zostaje odtworzona wokół obu zespołów rozdzielonych chromosomów, tak aby utworzyć dwa jądra komórkowe. Te pięć stadiów mitozy, razem z cytokinezą, zilustrowano w panelu 17-1 (s. 558–559). W tym podrozdziale prześledzimy, jak powstaje wrzeciono mitotyczne i jak ono działa.

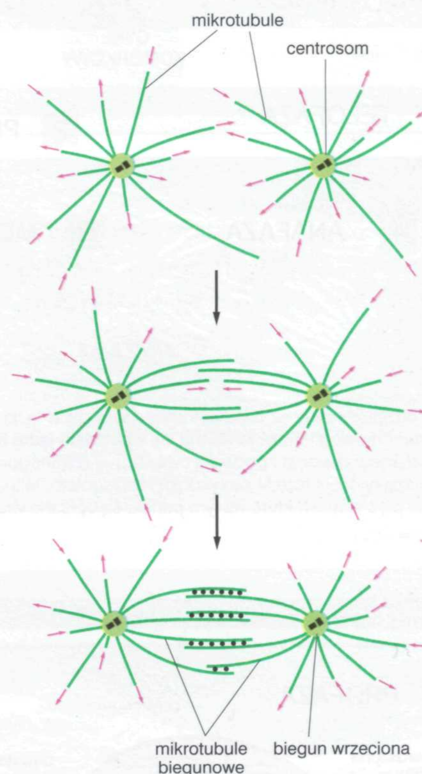
Wrzeciono mitotyczne zaczyna być montowane w profazie

W czasie interfazy większość komórek zwierzęcych zawiera cytoplazmatyczny układ mikrotubul, które rozchodzą się gwiaździście od pojedynczego centrosomu (jak omówiono w rozdz. 16). Pod koniec fazy S komórka replikuje swój centrosom, tak by powstały dwa potomne centrosomy, które początkowo pozostają razem po jednej stronie jądra. Po rozpoczęciu **profazy** siostrzane centrosomy rozdzielają się i przemieszczają na przeciwległe bieguny komórki, sterowane przez związane z centrosomem białka motoryczne, które zużywają energię pochodzącą z hydrolizy ATP do ruchu wzdłuż mikrotubul. (Ogólny mechanizm działania białek motorycznych omówiono w rozdz. 16). Każdy centrosom przyporządkowuje sobie własny układ mikrotubul i te dwa zespoły mikrotubul współdziałają ze sobą tworząc **wrzeciono mitotyczne** (patrz panel 17-1).

Jak omówiono w rozdz. 16, mikrotubule rozchodzące się gwiaździście od centrosomu w czasie interfazy w sposób ciągły polimeryzują i depolimeryzują poprzez dołączanie i odłączanie podjednostek tubuliny, która buduje mikrotubulę: poszczególne mikrotubule na przemian wydłużają się i skracają — proces ten jest zwany *dynamiczną niestabilnością* (patrz rys. 16-11). W taki sam sposób zachowują się mikrotubule odchodzące gwiaździście od każdego z rozdzielonych centrosomów potomnych na początku mitozy, lecz ich ruchy są bardziej dynamiczne, bowiem przełączanie z polimeryzacji na depolimeryzację zachodzi z szybkością 20 razy większą niż w mikrotubulach interfazowych. Ponadto, o wiele więcej mikrotubul odchodzi od każdego centrosomu i są one, przeciętnie, znacznie krótsze. Uważa się, że różnice te są odzwierciedleniem zmian w fosforylacji poszczególnych białek centrosomowych, które zachodzą na początku profazy.

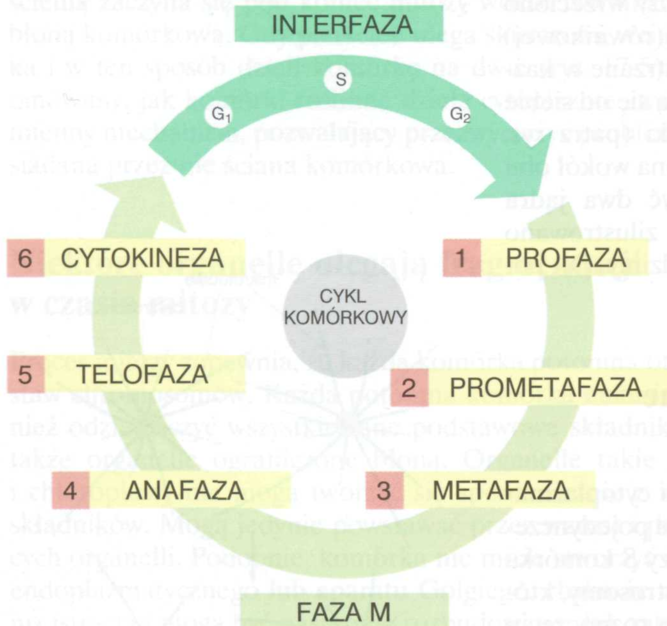
Szybko powiększające się i kurczące mikrotubule rozprzestrzeniają się we wszystkich kierunkach od obu centrosomów, penetrując wnętrze komórki. W czasie profazy, gdy otoczka jądrowa pozostaje jeszcze nienaruszona, niektóre z tych mikrotubul ulegają stabilizacji, przerywając proces demontażu i budują wysoce zorganizowane wrzeciono mitotyczne: niektóre z mikrotubul rosnących od przeciwległych centrosomów oddziałują wzajemnie na siebie wiążąc dwa zespoły mikrotubul i tworzą podstawową ramę wrzeciona mitotycznego o charakterystycznym dwubiegunowym kształcie. Te współdziałające mikrotubule zwane są *mikrotubulami biegunowymi* (ponieważ zaczynają się od dwóch biegunów wrzeciona), a dwa centrosomy, które dają im początek, są nazywane **biegunami wrzeciona** (rys. 17-7).

W następnym stadium mitozy dochodzi do ustawienia zreplikowanych chromosomów w taki sposób, by mogły zostać przeciągnięte do przeciwnych biegunów po rozdzieleniu się siostrzanych chromatyd.



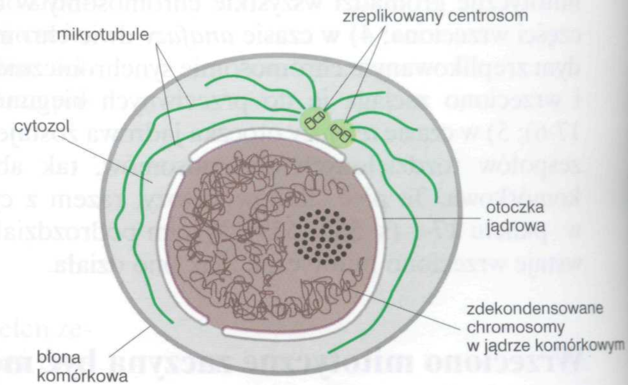
Rys. 17-7. Utworzenie dwubiegunowego wrzeciona mitotycznego dzięki selektywnej stabilizacji oddziałujących na siebie mikrotubul. Nowe mikrotubule rosną w przypadkowych kierunkach od dwóch centrosomów. W komórkach zwierzęcych w środku każdego centrosomu znajduje się para centriol (patrz rys. 16-10). Dwa końce mikrotubuli, zwane końcami plus i minus, mają różne właściwości. To właśnie koniec minus jest zakotwiczony w centrosomie (jak omówiono w rozdz. 16). Wolne końce plus są „dynamicznie niestabilne" i przełączają się nagle z równomiernego wydłużania (*czerwone strzałki skierowane na zewnątrz*) na gwałtowne skracanie (*czerwone strzałki skierowane do wnętrza*). Gdy dwie mikrotubule z przeciwległych centrosomów oddziałują wzajemnie na siebie w strefie zachodzenia, białka związane z mikrotubulami łączą takie mikrotubule razem ze sobą (*czarne punkty*) w taki sposób, że ich końce ulegają stabilizacji poprzez zmniejszenie prawdopodobieństwa depolimeryzacji

PODZIAŁ KOMÓRKI I CYKL KOMÓRKOWY



Podział komórki na dwie potomne zachodzi w fazie M cyklu komórkowego. Faza M składa się z podziału jądra komórkowego (zwanego mitozą) i podziału cytoplazmy (zwanego cytokinezą). Dla przejrzystości fazę M na rysunku rozciągnięto. Mitoza dzieli się z kolei na pięć etapów, które na tym panelu są opisane wraz z cytokinezą.

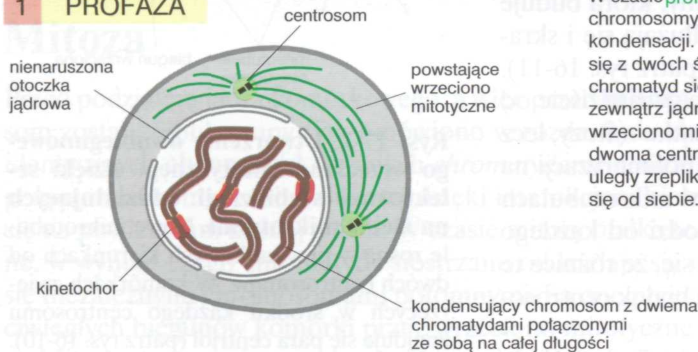
INTERFAZA



W czasie interfazy komórka powiększa swoje rozmiary. DNA w chromosomach i centrosom zostają zreplikowane.

Mikrografie świetlne pokazane na tym panelu przedstawiają żywą komórkę z nabłonka płucnego traszki. Tę samą komórkę fotografowano w różnych momentach jej podziału na dwie komórki potomne. (Dzięki uprzejmości: Conly L. Rieder)

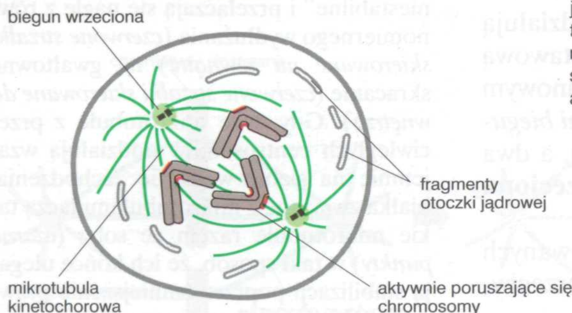
1 PROFAZA



W czasie profazy zreplikowane chromosomy ulegają kondensacji. Każdy z nich składa się z dwóch ściśle związanych chromatyd siostrzanych. Na zewnątrz jądra tworzy się wrzeciono mitotyczne pomiędzy dwoma centrosomami, które uległy zreplikowaniu i oddalają się od siebie.



2 PROMETAFAZA

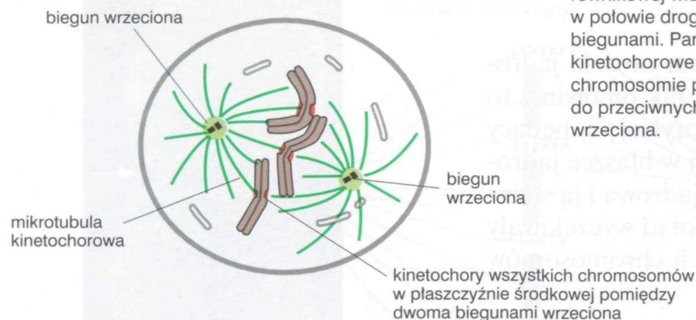


Prometafaza zaczyna się nagle wraz z rozpadem otoczki jądrowej. Chromosomy mogą teraz przymocować się do mikrotubul wrzeciona poprzez swe kinetochory. Podejmują aktywne ruchy.

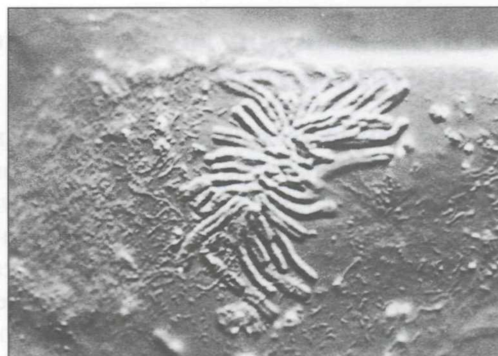


 Panel 17-1. Podstawowe stadia fazy M (mitozy i cytokinezy) w komórce zwierzęcej

3 METAFAZA

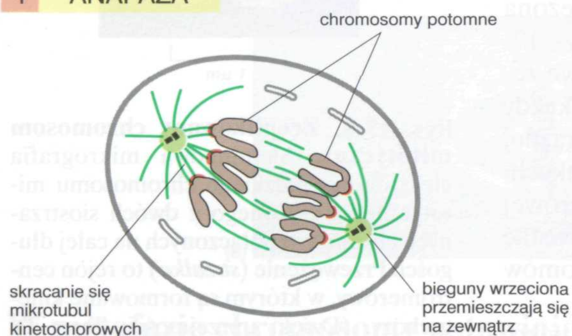


W czasie metafazy chromosomy ustawiają się w płaszczyźnie równikowej wrzeciona, w połowie drogi między biegunami. Parzyste mikrotubule kinetochorowe na każdym chromosomie przyczepiają je do przeciwnych biegunów wrzeciona.

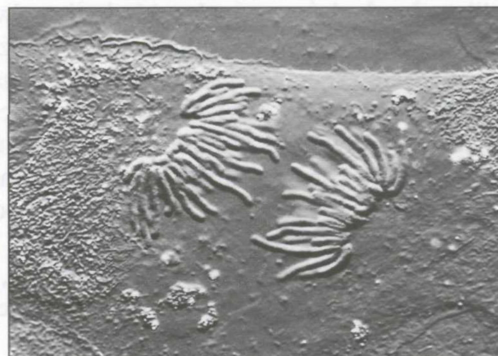


czas = 250 min

4 ANAFAZA

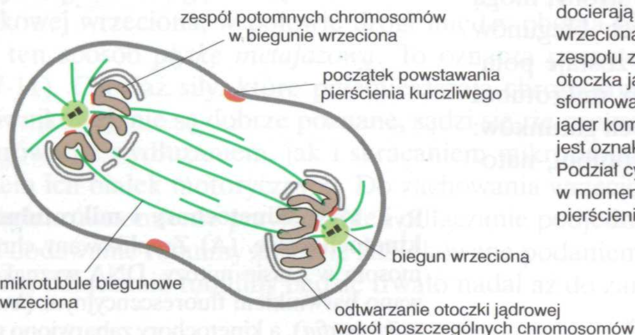


W anafazie parzyste chromatydy synchronicznie rozdzielają się i tworzą po dwa potomne chromosomy. Każdy z nich jest *powoli odciągany do tego* bieguna wrzeciona, do którego jest zwrócony. Mikrotubule kinetochorowe skracają się, a także bieguny wrzeciona oddalają się od siebie. Dzięki obu tym procesom chromosomy rozdzielają się.



czas = 279 min

5 TELOFAZA

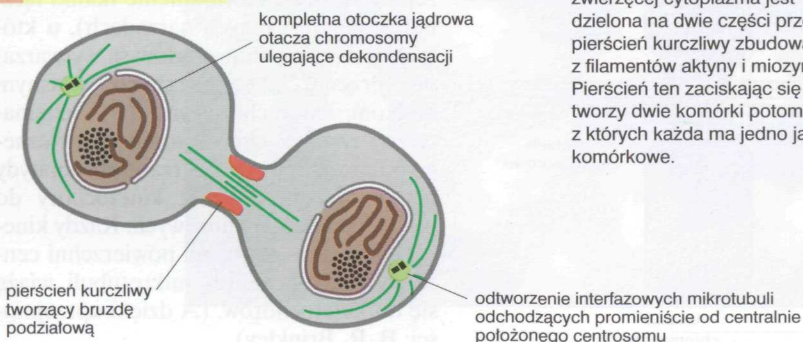


Podczas telofazy dwa zespoły chromosomów potomnych docierają do biegunów wrzeciona. Wokół każdego zespołu zostaje odtworzona otoczka jądrowa, co prowadzi do sformowania dwóch nowych jąder komórkowych, a zarazem jest oznaką ukończenia mitozy. Podział cytoplazmy zaczyna się w momencie powstawania pierścienia kurczliwego.



czas = 315 min

6 CYTOKINEZA



Podczas cytokinezy komórki zwierzęcej cytoplazma jest dzielona na dwie części przez pierścień kurczliwy zbudowany z filamentów aktyny i miozyny. Pierścień ten zaciskając się tworzy dwie komórki potomne, z których każda ma jedno jądro komórkowe.



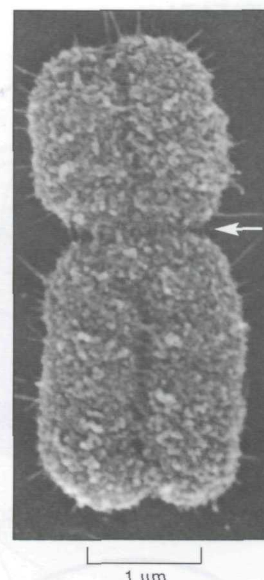
czas = 362 min

Chromosomy przymocowują się do wrzeciona mitotycznego w prometafazie

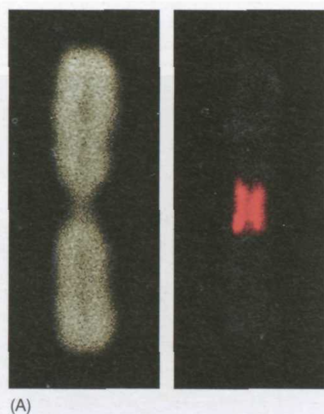
Prometafaza zaczyna się nagle wraz z rozmontowaniem otoczki jądrowej, która rozpada się na małe, obłonione pęcherzyki. Jak omówimy to później, proces ten zostaje zapoczątkowany przez fosforylację i, będący jej konsekwencją, rozkład białek filamentów pośrednich w blaszce jądrowej, tj. sieci fibrylarnych białek, które leżą pod otoczką jądrową i ją stabilizują (patrz rys. 14-8). Mikrotubule wrzeciona, które dotąd wyczekiwały na zewnątrz jądra, mają teraz dostęp do zreplikowanych chromosomów i wiążą się do nich (patrz panel 17-1, s. 558–559).

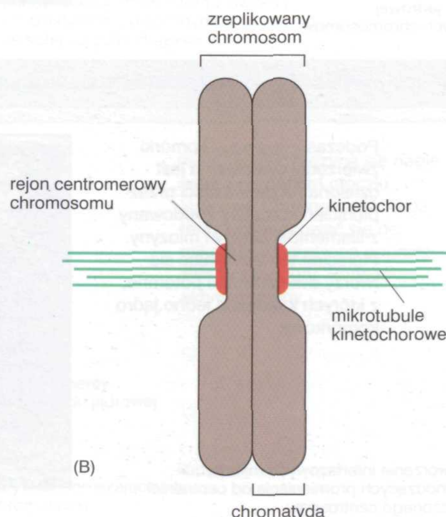
Mikrotubule wrzeciona wiążą chromosomy poprzez wyspecjalizowane kompleksy białkowe zwane **kinetochorami**, które są formowane na chromosomie w późnej profazie. Jak omówiono w rozdz. 8, każdy ze zreplikowanych chromosomów składa się z dwóch siostrzanych chromatyd połączonych ze sobą na całej długości, a każda z chromatyd jest przewężona w miejscu o specjalnej sekwencji DNA, nazywanym *centromerem* (rys. 17-8; patrz także rys. 8-5). Tuż przed prometafazą białka kinetochorowe zestawiają się w duży kompleks na każdym z centromerów. Dlatego każdy podwojony chromosom zawiera dwa kinetochory (po jednym na każdej siostrzanej chromatydzie), które są zwrócone w przeciwnych kierunkach. Zmontowanie kinetochorów całkowicie jest zależne od centromerowej sekwencji DNA: gdy brak tej sekwencji, kinetochory nie mogą powstać i w rezultacie nie dochodzi do odpowiedniej segregacji chromosomów w czasie mitozy.

Gdy już otoczka jądrowa ulegnie rozpadowi, mikrotubula, jeśli tylko, penetrując obszar jądra, natknie się przypadkowo na kinetochor, przyłączy się do niego i pochwyci w ten sposób chromosom. Mikrotubula nazywa się wtedy *mikrotubulą kinetochorową* i łączy chromosom z biegunem wrzeciona (rys. 17-9; patrz panel 17-1, s. 558–559). Dzięki temu, że kinetochory siostrzanych chromatyd są zwrócone na przeciwne strony, mogą przyczepiać się do mikrotubul biegnących od przeciwnych biegunów wrzeciona. W taki sposób każdy zreplikowany chromosom zostaje połączony z dwoma biegunami wrzeciona (rys. 17-10). Liczba mikrotubul przyłączonych do każdego kinetochoru jest zmienna u różnych gatunków: na przykład każdy kinetochor człowieka wiąże 20–40 mikrotubul, natomiast kinetochor drożdży wiąże tylko jedną mikrotubulę.

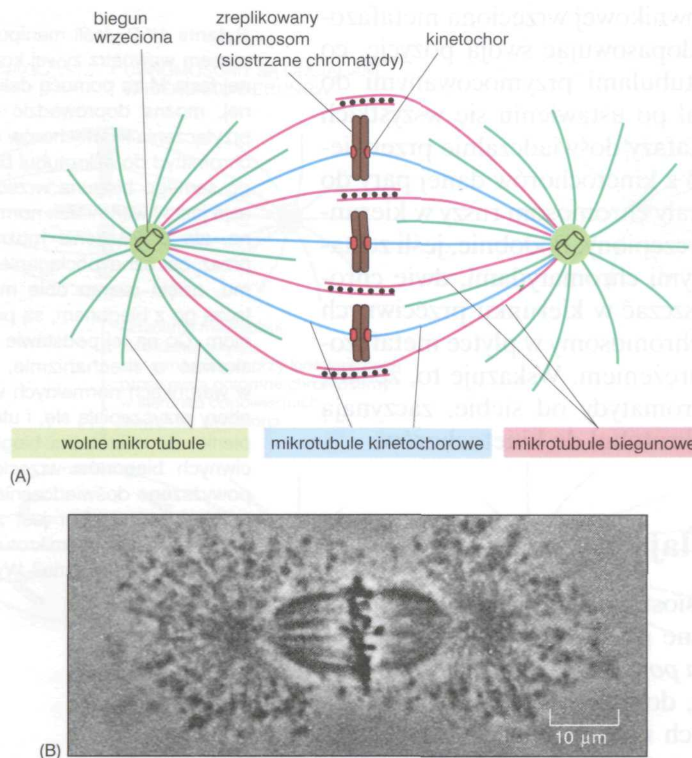


Rys. 17-8. Zreplikowany chromosom mitotyczny. Skaningowa mikrografia elektronowa ludzkiego chromosomu mitotycznego, złożonego z dwóch siostrzanych chromatyd połączonych na całej długości. Przewężenie (*strzałka*) to rejon centromerowy, w którym są formowane kinetochory. (Dzięki uprzejmości: Terry D. Allen)





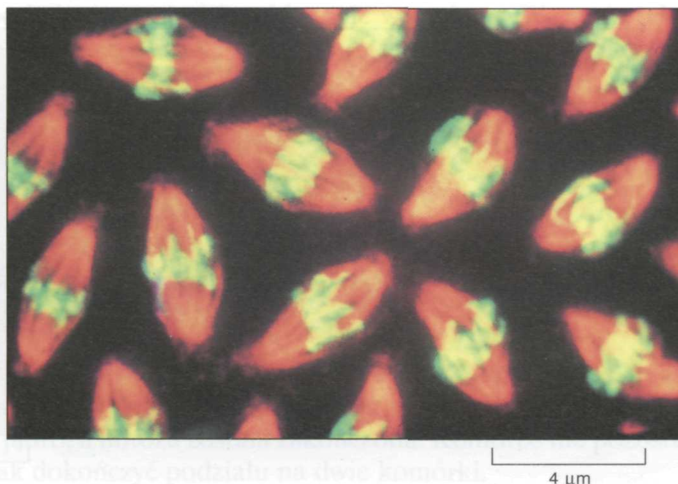
Rys. 17-9. Kinetochory i mikrotubule kinetochorowe. (A) Zreplikowany chromosom w czasie mitozy. DNA wyznakowano barwnikiem fluorescencyjnym (*lewa mikrografia*), a kinetochory zabarwiono na *czerwono* fluorescencyjnymi przeciwciałami, które rozpoznają białka kinetochoru (*prawa mikrografia*). Przeciwciała te pochodzą od chorych na sklerodermię (choroba wywołująca zwłóknienie tkanki łącznej w skórze i innych narządach), u których z nieznanych powodów są wytwarzane przeciwciała przeciwko własnym białkom kinetochorowym. (B) Schematyczny rysunek chromosomu mitotycznego pokazujący dwie siostrzane chromatydy przymocowane poprzez kinetochory do mikrotubul kinetochorowych. Każdy kinetochor tworzy płytkę na powierzchni centromeru. Końce plus mikrotubuli wiążą się do kinetochorów. (A dzięki uprzejmości: B. R. Brinkley)



Rys. 17-10. Trzy typy mikrotubul we wrzecionie mitotycznym. (A) Schematyczny rysunek wrzeciona z przymocowanymi doń chromosomami, pokazujący trzy typy mikrotubul wrzeciona — wolne mikrotubule nie przyczepione do chromosomów, mikrotubule kinetochorowe i mikrotubule biegunowe. W rzeczywistości chromosomy są znacznie większe i zwykle wiele mikrotubul jest przymocowanych do każdego kinetochoru. (B) Mikrografia świetlna kontrastowo-fazowa wrzeciona mitotycznego wyizolowanego w metafazie wyraźnie pokazuje chromosomy ustawione w płaszczyźnie równikowej wrzeciona. (B dzięki uprzejmości: E. D. Salmon, R. R. Segall, z *J. Cell Biol.* 86: 355–365, 1980, copyright permission of the Rockefeller University Press)

W metafazie chromosomy ustawiają się w płaszczyźnie równikowej wrzeciona

W czasie prometafazy chromosomy, teraz już przymocowane do wrzeciona mitotycznego, zaczynają się poruszać, jak gdyby zapuszczając się to w jedną, to w drugą stronę. Ostatecznie ustawiają się w płaszczyźnie równikowej wrzeciona, w połowie drogi między oboma biegunami, tworząc w ten sposób *płytkę metafazową*. To oznacza początek **metafazy** (rys. 17-11). Chociaż siły, które przemieszczają chromosomy do płaszczyzny równikowej, nie są dobrze poznane, sądzi się, że proces ten jest związany zarówno z wydłużaniem, jak i skracaniem mikrotubul, a także z działaniem ich białek motorycznych. Do zachowania wrzeciona konieczne jest ciągłe, równomierne przyłączanie i odłączanie podjednostek tubuliny: jeśli dodawanie tubuliny zostanie zablokowane podaniem alkaloidu kolchicyny, odłączanie tubuliny będzie trwało nadal aż do zaniku wrzeciona.



Rys. 17-11. Liczne wrzeciona mitotyczne w metafazie u embriona muszki owocowej (*Drosophila*). Mikrotubule są zabarwione na *czerwono*, a chromosomy na *zielono*. W tym stadium rozwojowym *Drosophila* liczne jądra komórkowe znajdują się w dużym, wspólnym przedziale cytoplazmatycznym. Wszystkie jądra dzielą się synchronicznie. Chociaż wrzeciona metafazowe są zwykle ilustrowane w ujęciu dwuwymiarowym, tak jak i na tej mikrografii, w obrazie trójwymiarowym chromosomy są skupione w formie płytki w płaszczyźnie równikowej wrzeciona — w tak zwanej płytce metafazowej. (Dzięki uprzejmości: William Sullivan)

Chromosomy zebrane w płaszczyźnie równikowej wrzeciona metafazowego oscylują tam i z powrotem, ciągle dopasowując swoją pozycję, co wskazuje, że przeciąganie między mikrotubulami przymocowanymi do każdego z biegunów wrzeciona trwa nadal po ustawieniu się wszystkich chromosomów w płytce. Jeśli w czasie metafazy doświadczalnie przerwiemy wiązką laserową przyczepienie jednego z kinetochorów danej pary do mikrotubuli kinetochorowej, natychmiast cały chromosom ruszy w kierunku tego bieguna, do którego pozostaje przyczepiony. Podobnie, jeśli zostanie przecięte połączenie między siostrzanymi chromatydami, dwie chromatydy rozdzielą się i zaczną się przemieszczać w kierunku przeciwnych biegunów. Te doświadczenia pokazują, że chromosomy w płytce metafazowej są przytrzymywane pod znacznym naprężeniem. Wskazuje to, że siły, które ostatecznie odciągną siostrzane chromatydy od siebie, zaczynają działać natychmiast po przymocowaniu mikrotubul do kinetochorów.

Pytanie 17-3. Jeśli manipuluje się chromosomem wewnątrz żywej komórki we wczesnej fazie M za pomocą delikatnej igły szklanej, można doprowadzić do omyłkowego przyłączenia kinetochorów obu siostrzanych chromatyd do mikrotubul biegnących od tego samego bieguna wrzeciona. Taka sytuacja jest w warunkach normalnych niestabilna, ale przyłączenie można utrzymać poprzez ostrożne pociąganie igłą chromosomu, dzięki czemu obie mikrotubule, które łączą go z biegunem, są poddane naprężeniom. Co na tej podstawie możesz wywnioskować o mechanizmie, dzięki któremu w warunkach normalnych w fazie M kinetochory przyczepiają się, i utrzymują przyczepienie, do mikrotubul biegnących od przeciwnych biegunów wrzeciona? Czy wynik powyższego doświadczenia sugeruje możliwość, że kinetochor jest zaprogramowany do przyłączenia do mikrotubuli z określonego bieguna wrzeciona? Wyjaśnij swoje odpowiedzi.

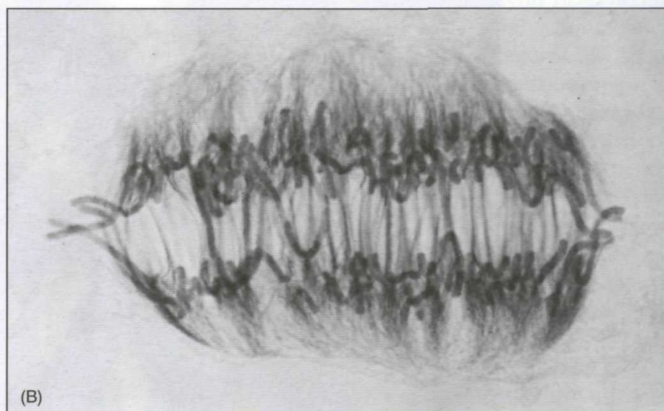
Siostrzane chromosomy rozdzielają się w anafazie

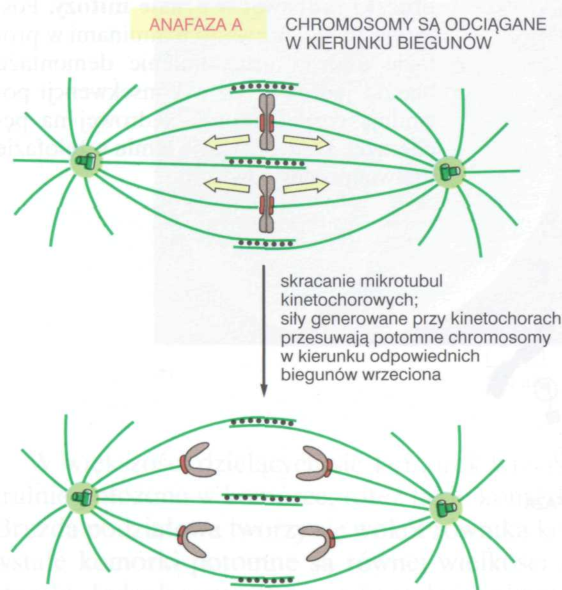
Na początku **anafazy** połączenia między siostrzanymi chromatydami zostają przecięte przez enzymy proteolityczne pozwalając, by każda chromatyda (teraz już nazywana *chromosomem potomnym*) została stopniowo przeciągnięta do tego bieguna wrzeciona, do którego jest przyczepiona poprzez mikrotubulę (rys. 17-12). Ten ruch rozdziela lub *segreguje* dwa identyczne zespoły chromosomów do przeciwnych krańców wrzeciona (patrz panel 17-1, s. 558–559). Wszystkie nowo oddzielone chromosomy wędrują z taką samą szybkością, ok. 1 μm na minutę. Ich ruch jest rezultatem dwóch niezależnych procesów, w których pośredniczą odmienne części wrzeciona mitotycznego. Te procesy są zwane *anafazą A* i *anafazą B*, a zachodzą mniej więcej jednocześnie. W anafazie A mikrotubula kinetochorowa ulega skróceniu poprzez depolimeryzację i dzięki temu przyczepiony do niej chromosom przemieszcza się w kierunku bieguna. W anafazie B same bieguny wrzeciona oddalają się od siebie, przyczyniając się w ten sposób do dalszej segregacji dwóch grup chromosomów.

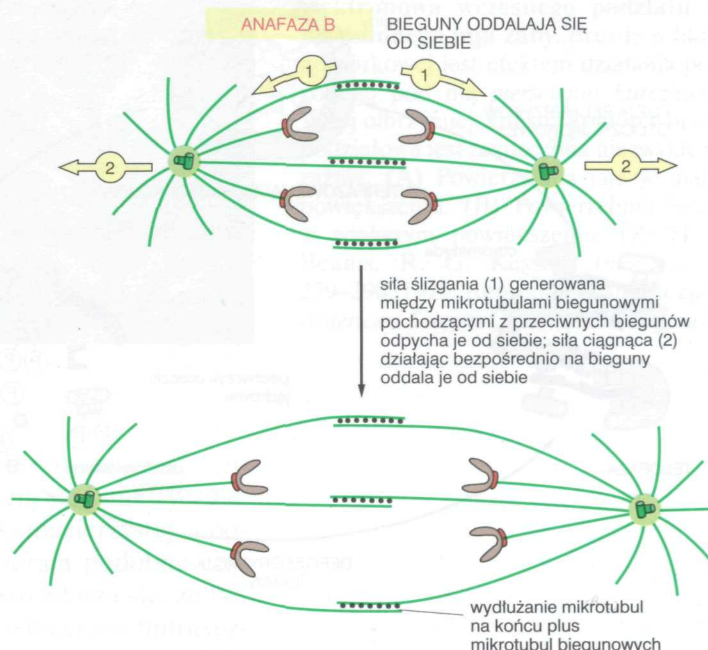
Uważa się, że siły napędowej do ruchu w anafazie A dostarcza głównie działanie mikrotubularnych białek motorycznych funkcjonujących przy kinetochorze, a częściowo także utrata podjednostek tubuliny, która zachodzi przede wszystkim przy kinetochorowym końcu mikrotubul kinetochorowych. Możliwe jest również, że kinetochor i przyczepiony do niego chromosom są przez białka motoryczne „przeprowadzane" po mikrotubuli kinetochorowej w kierunku bieguna, a koniec plus każdej mikrotubuli ulega depolimeryzacji, skoro tylko zostanie odsłonięty.

Rys. 17-12. Rozdzielenie siostrzanych chromatyd w anafazie. W momencie przejścia z metafazy (A) w anafazę (B) siostrzane chromatydy rozdzielają się i są odciągane przez mikrotubule wrzeciona — jak w pokazanych komórkach bielma lilii, zabarwionych przeciwciałami znakującymi złotem mikrotubule. Komórki roślinne mają zwykle mniej ostro zaznaczone bieguny wrzeciona niż komórki zwierzęce. Chociaż bieguny nie są widoczne, znajdują się u góry i u dołu każdej z tych mikrografii. (Dzięki uprzejmości: Andrzej Bajer)









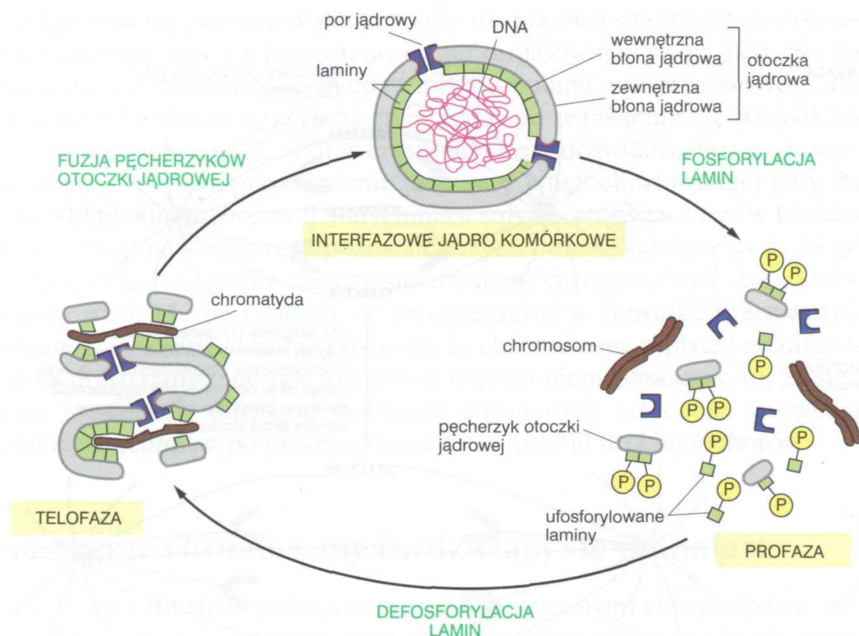
Rys. 17-13. Dwa procesy, które rozdzielają siostrzane chromatydy w anafazie. W *anafazie A* siostrzane chromosomy są *przeciągane* do przeciwległych biegunów dzięki mikrotubulom kinetochorowym ulegającym depolimeryzacji przy kinetochorze. Siła do tego ruchu jest generowana przede wszystkim przy kinetochorze. W *anafazie B* dwa bieguny wrzeciona oddalają się w wyniku działania dwóch odrębnych sił: (1) wydłużanie i ślizganie się biegunowych mikrotubul po sobie *odpycha* oba bieguny od siebie oraz (2) zewnętrzne siły wywierane przez skierowane na zewnątrz mikrotubule w obrębie każdego bieguna wrzeciona *odciągają* bieguny od siebie w kierunku części obwodowej komórki. Uważa się, że wszystkie te siły zależą od działania białek motorycznych związanych z mikrotubulami

Oddalaniu się biegunów wrzeciona w anafazie B towarzyszy wydłużanie się biegunowych mikrotubul, które polimeryzują na ich wolnym końcu plus. Uważa się, że siłę napędową do tego procesu zapewniają dwa zespoły białek motorycznych działających na mikrotubulach biegunowych. Jeden z tych zespołów funkcjonuje na długich mikrotubulach biegunowych, które tworzą wrzeciono. Te białka motoryczne, działając w równikowej części wrzeciona, przesuwają po sobie biegunowe mikrotubule z przeciwległych biegunów, odpychając w ten sposób bieguny wrzeciona od siebie. Drugi zespół działa na mikrotubulach, które wystają z biegunów wrzeciona, lecz są skierowane od centrosomu do obwodowej części komórki. Sądzi się, że te białka motoryczne są związane z obwodową częścią komórki i wciągają każdy biegun w kierunku pobliskiej błony komórkowej, jednocześnie oddalając go od przeciwległego bieguna (rys. 17-13).

Otoczka jądrowa odtwarza się w telofazie

Pod koniec anafazy potomne chromosomy są już rozdzielone na dwie równe grupy, po jednej przy każdym biegunie wrzeciona. W czasie **telofazy**, końcowego stadium mitozy, wokół obu grup chromosomów zostaje odtworzona otoczka jądrowa i są formowane dwa jądra potomne. Pęcherzyki błony jądrowej skupiają się początkowo wokół poszczególnych chromosomów, a następnie łączą się ze sobą, by odtworzyć otoczkę jądrową (patrz panel 17-1, s. 558–559). Podczas tego procesu w otoczce (jak omówiono w rozdz. 14) zostają zrekonstruowane pory jądrowe, a jądrowe laminy, czyli podjednostki białek filamentów pośrednich, które zostały ufosforylowane w czasie profazy, są z kolei defosforylowane i ulegają reasocjacji odtwarzając blaszkę jądrową (rys. 17-14). Zaraz po odbudowaniu otoczki jądrowej pory zaczynają wpompowywać białka jądrowe, jądro powiększa się, skondensowane chromosomy ulegają dekondensacji do ich interfazowego stanu, co umożliwia podjęcie na nowo transkrypcji genów. Powstało nowe jądro, a mitoza została zakończona. Komórce nie pozostaje nic innego, jak dokończyć podziału na dwie komórki.

Pytanie 17-4. Zastanów się nad zdarzeniami, które prowadzą do utworzenia nowego jądra w telofazie. W jaki sposób białka jądrowe i cytozolowe zostają prawidłowo porozdzielane tak, że nowe jądro zawiera wyłącznie białka jądrowe, a nie ma w nim białek cytozolowych?



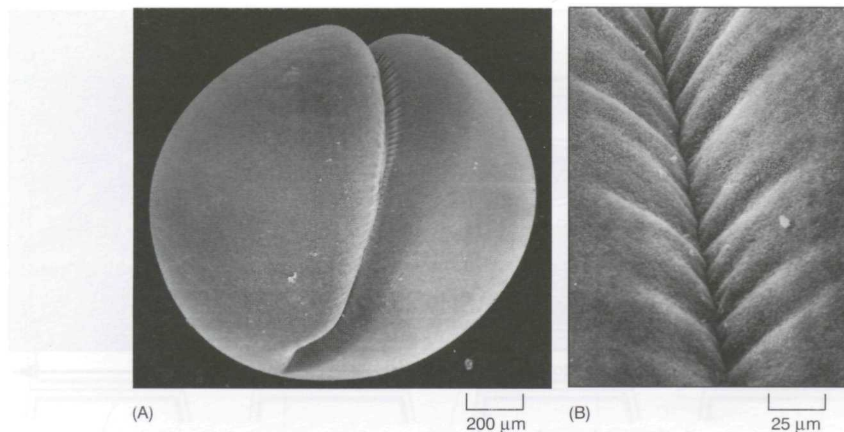
Rys. 17-14. Rozpad i odtworzenie otoczki jądrowej w czasie mitozy. Fosforylacja białek zwanych laminami w profazie ułatwia uruchomienie demontażu blaszki jądrowej, co w konsekwencji powoduje rozpad otoczki jądrowej na pęcherzyki. Defosforylacja lamin w telofazie ułatwia proces odwrotny

Cytokineza

Faza M to nie tylko segregacja chromosomów i formowanie nowych jąder. Jest to również czas, w którym inne składniki komórki — błony, cytoszkielet, organelle i rozpuszczalne białka — zostają rozdzielone między dwie komórki potomne. Dochodzi do tego w **cytokinezie,** procesie, w trakcie którego cytoplazma zostaje podzielona na dwie części. Cytokineza zwykle rozpoczyna się w anafazie, lecz nie kończy się wcześniej niż zostaną uformowane dwa jądra potomne. Gdy w mitozie uczestniczy przejściowa struktura utworzona z mikrotubul, tj. wrzeciono mitotyczne, to w cytokinezie komórki zwierzęcej bierze udział przejściowa struktura zbudowana z filamentów aktynowych, *pierścień kurczliwy* (patrz rys. 17-5). Jednak zarówno płaszczyzna podziału w cytokinezie, jak i jej ramy czasowe są zdeterminowane przez wrzeciono mitotyczne.

Wrzeciono mitotyczne determinuje płaszczyznę podziału cytoplazmatycznego

Pierwszym widocznym objawem cytokinezy w komórce zwierzęcej jest pojawienie się w czasie anafazy pomarszczenia i bruzdy w błonie komórkowej (rys. 17-15). Takie bruzdowate wcięcie niezmiennie tworzy się prostopadle do osi podłużnej wrzeciona mitotycznego, gwarantując, że *bruzda podziałowa* przetnie komórkę między dwiema grupami chromosomów potomnych w taki sposób, iż każda komórka potomna otrzyma identyczne i kompletne zestawy chromosomów. Jeśli zaraz po pojawieniu się bruzdy wrzeciono mitotyczne zostanie rozmyślnie przemieszczone (za pomocą delikatnej igły szklanej wprowadzonej do komórki), początkowa bruzda zniknie, a nowa rozwinie się w miejscu odpowiadającym nowemu położeniu i orientacji wrzeciona. Natomiast jeśli proces bruzdkowania jest już zaawansowany, podział nastąpi nawet wtedy, gdy wrzeciono mitotyczne zostanie sztucznie wyssane z komórki lub zdepolimeryzowane za pomocą kolchicyny. Tajemnicą pozostaje, w jaki sposób wrzeciono mitotyczne narzuca miejsce powstawania bruzdy podziałowej.



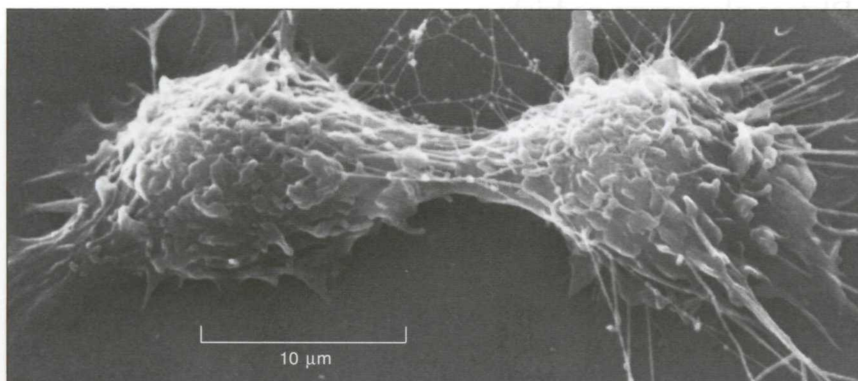
Rys. 17-15. Skaningowa mikrografia elektronowa wczesnego podziału zapłodnionego jaja żaby. Bruzda w błonie komórkowej jest efektem działania położonego pod nią *pierścienia kurczliwego*. W tej olbrzymiej, kulistej komórce bruzda podziałowa jest zaznaczona niezwykle wyraźnie. (A) Powierzchnia jaja w małym powiększeniu. (B) Powierzchnia bruzdy w większym powiększeniu. (Z: H. W. Beams, R. G. Kessel, *Am. Sci*. 36: 279–290, 1976. Reprodukowane za zgodą *American Scientist*, czasopismo Sigma Xi)

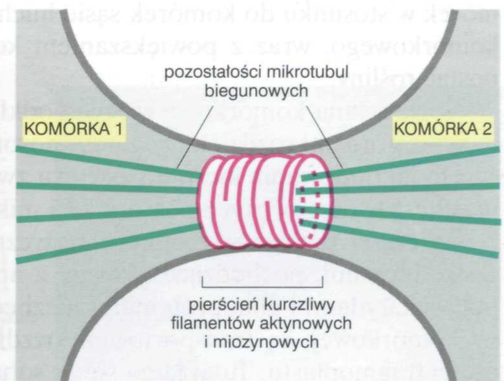
W większości dzielących się komórek wrzeciono mitotyczne jest centralnie położone w komórce, toteż takie komórki dzielą się symetrycznie. Bruzda podziałowa tworzy się wokół równika komórki macierzystej, a powstałe komórki potomne są równej wielkości i zawierają podobne cząsteczki. Jednak w czasie rozwoju embrionalnego często zdarza się, że komórki dzielą się asymetrycznie. W tych przypadkach wrzeciono mitotyczne jest ustawione asymetrycznie i, w konsekwencji, bruzda stwarza dwie komórki, które różnią się wielkością, a często także zawartymi cząsteczkami i które zwykle rozwijają się w komórki różnego typu.

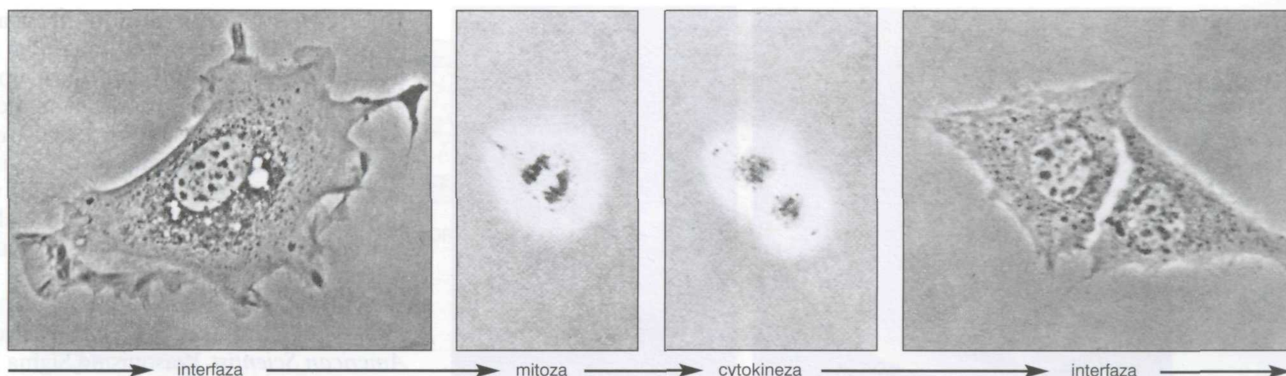
Pierścień kurczliwy w komórkach zwierzęcych jest zbudowany z aktyny i miozyny

Pierścień kurczliwy jest głównie złożony z zachodzących na siebie filamentów aktyny i miozyny (rys. 17-16). Zostaje zmontowany w anafazie i jest przyczepiony do białek związanych z cytoplazmatyczną stroną błony komórkowej. Zaraz po zmontowaniu jest on zdolny do wywarcia siły wystarczającej do zgięcia delikatnej igły szklanej wprowadzonej do komórki przed cytokinezą. Siła ta jest generowana przez filamenty aktynowe ślizgające się po filamentach miozynowych, jak w czasie skurczu mięśnia (patrz rys. 16-36). Jednak w odróżnieniu od kurczliwego aparatu mięśnia, pierścień kurczliwy jest strukturą przejściową: zostaje zmontowany w celu przeprowadzenia cytokinezy i staje się stopniowo coraz mniejszy w trakcie tego procesu, aż znika zupełnie, gdy tylko komórka podzieli się na dwie.

Rys. 17-16. Pierścień kurczliwy. (A) Skaningowa mikrografia elektronowa komórki zwierzęcej w hodowli w ostatniej fazie dzielenia. (B) Schematyczny diagram środkowego rejonu podobnej komórki pokazujący pierścień kurczliwy położony pod błoną komórkową oraz pozostałości po dwóch zespołach mikrotubul biegunowych. (A dzięki uprzejmości: Guenter Albrecht-Buehler)







Podziałowi wielu komórek zwierzęcych towarzyszą duże zmiany kształtu komórki oraz zmniejszenie ich przylegania do substancji zewnątrzkomórkowej. Te zmiany są wynikiem reorganizacji filamentów aktyny i miozyny w obwodowej części komórki, a jednym z przejawów tej reorganizacji jest utworzenie pierścienia kurczliwego. Hodowane fibroblasty ssaków rozpościerają się płasko w czasie interfazy, co jest wynikiem silnej adhezji do powierzchni (zwanej podłożem), na której rosną. Gdy jednak komórki te wejdą w fazę M, zaokrąglają się, przynajmniej częściowo, ponieważ niektóre z białek błonowych odpowiedzialnych za przyleganie komórek do podłoża — *integryny* (jak omówiono w rozdz. 19) — zostają ufosforylowane, co osłabia ich działanie adhezyjne. Natychmiast po zakończeniu cytokinezy komórki potomne odtwarzają swoje kontakty z podłożem i ponownie ulegają rozpłaszczeniu (rys. 17-17). Gdy komórki dzielą się w obrębie tkanek zwierzęcych, ten cykl przylegania i odłączania prawdopodobnie pozwala im rearanżować kontakty z sąsiadującymi komórkami oraz z substancją pozakomórkową, toteż komórki nowo powstałe w wyniku podziału mogą być wbudowywane w tkankę.

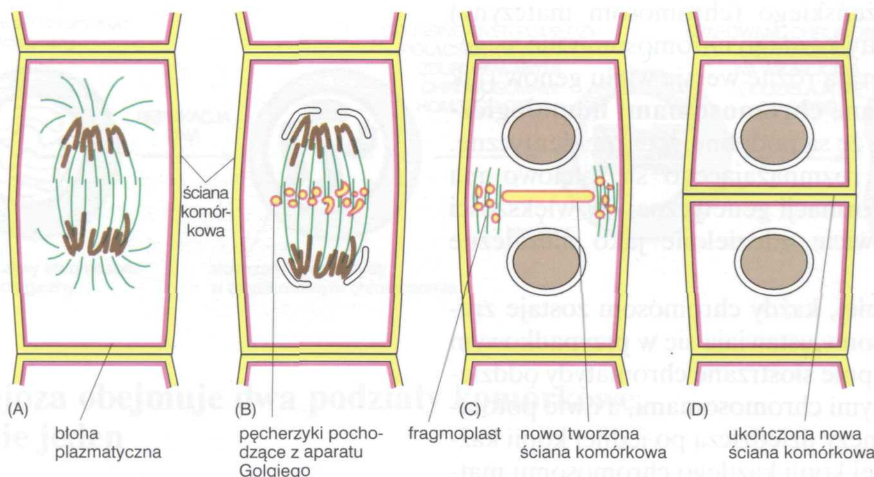
Rys. 17-17. Mikrografie fibroblastu myszy dzielącego się w hodowli. Tę samą komórkę przedstawiono na wykonanych sukcesywnie mikrografiach. Zwróć uwagę, jak komórka zaokrągla się przystępując do mitozy. Z kolei dwie potomne komórki ulegają spłaszczeniu po zakończeniu cytokinezy. (Dzięki uprzejmości: Guenter Albrecht-Buehler)

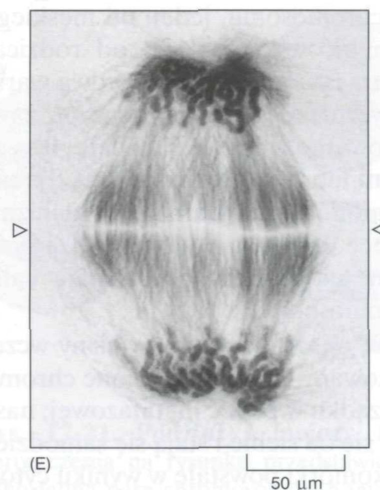
Cytokineza w komórkach roślinnych obejmuje utworzenie nowej ściany komórkowej

U roślin wyższych mechanizm cytokinezy jest całkowicie odmienny niż w komórkach zwierzęcych, prawdopodobnie dlatego, że komórki roślinne są otoczone przez zwartą ścianę komórkową (jak omówiono w rozdz. 19). Dwie komórki potomne są rozdzielane nie w wyniku działania pierścienia kurczliwego, lecz w rezultacie zbudowania nowej ściany wewnątrz komórki. Rozrastająca się nowa ściana komórkowa jest otaczana przez błonę i powiększa się dzieląc cytoplazmę na dwie części. Miejsce powstawania tej nowej ściany precyzyjnie determinuje położenie dwóch potomnych komórek w stosunku do komórek sąsiednich. Dlatego płaszczyzny podziału komórkowego, wraz z powiększaniem komórek, determinują końcową postać rośliny.

Nowa ściana komórkowa zaczyna odkładać się w cytoplazmie między dwiema grupami rozdzielonych chromosomów na początku telofazy. Procesem jej budowania kieruje struktura zwana **fragmoplastem**. Fragmoplast jest tworzony przez pozostałości mikrotubul biegunowych w równikowej części starego wrzeciona mitotycznego. Małe pęcherzyki ograniczone błonami, pochodzące głównie z aparatu Golgiego, a wypełnione polisacharydami i glikoproteinami niezbędnymi do budowy matriks ściany komórkowej, są transportowane wzdłuż mikrotubul do równikowej części fragmoplastu. Tutaj łączą się ze sobą i tworzą ograniczoną błonami strukturę w kształcie dysku, która powiększa się obwodowo poprzez fuzję

Pytanie 17-5. Narysuj szczegółowy obraz tworzenia nowej ściany komórkowej, która rozdziela komórki potomne po podziale komórki roślinnej. W szczególności zaznacz, gdzie trafiają białka błonowe pęcherzyków pochodzących z aparatu Golgiego, wskazując, co staje się z tymi białkami błon pęcherzyków Golgiego, które są eksponowane po stronie wewnętrznej tych pęcherzyków. (Zajrzyj do rozdz. 11, jeśli potrzebujesz przypomnienia, jak zbudowana jest błona).





Rys. 17-18. Cytokineza w komórce roślinnej. Na początku telofazy, po tym jak chromosomy zostały rozdzielone (A), wewnątrz komórki rozpoczyna się budowa nowej ściany komórkowej w płaszczyźnie równikowej starego wrzeciona (B). Mikrotubule biegunowe wrzeciona mitotycznego zachowane w telofazie tworzą *fragmoplast* i kierują pęcherzyki do środka wrzeciona. Tutaj pęcherzyki błonowe, pochodzące z aparatu Golgiego i wypełnione materiałem przeznaczonym do ściany komórkowej, ulegają fuzji i budują nową ścianę komórkową (C), która przyrasta na zewnątrz, aż osiągnie błonę komórkową i pierwotną ścianę komórkową. Błona komórkowa i błona otaczająca nową ścianę komórkową (obie wyróżniono kolorem *czerwonym*) łączą się ze sobą, całkowicie rozdzielając dwie komórki potomne (D). Mikrografię świetlną komórki roślinnej w telofazie pokazano na zdjęciu (E) w momencie odpowiadającym rysunkowi (B). Komórkę wybarwiono w celu pokazania zarówno mikrotubul, jak i obu zespołów chromosomów potomnych. Lokalizację rosnącej nowej ściany komórkowej pokazują strzałki. (E dzięki uprzejmości: Andrzej Bajer)

z kolejnymi pęcherzykami tak długo, aż dotrze do błony komórkowej i pierwotnej ściany komórki. W taki sposób komórka zostaje podzielona na dwie (rys. 17-18). Później, w matriks ściany są odkładane mikrofibryle celulozowe i kończy się konstrukcja nowej ściany komórkowej.

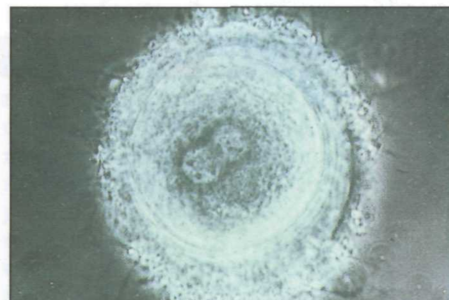
Mejoza

Mejozę odkryto w 1883 roku, gdy zauważono, że zapłodnione jajo jednego z robaków zawiera cztery chromosomy, natomiast gamety tego robaka (plemniki u samców i jaja u samic) miały ich tylko dwa. Wtedy po raz pierwszy uświadomiono sobie, że gamety, komórki wyspecjalizowane w rozmnażaniu płciowym, są **haploidalne**, gdyż zawierają tylko pojedynczy zestaw chromosomów. Natomiast wszystkie pozostałe komórki ciała, włącznie z komórkami linii płciowej, które dają początek gametom, są **diploidalne**, ponieważ mają dwa zestawy chromosomów, jeden pochodzący od organizmu matczynego, a drugi od ojcowskiego (patrz rys. 9-34). Ta obserwacja nasunęła przypuszczenie, że plemniki i jaja (rys. 17-19) muszą powstawać w drodze specjalnego podziału komórkowego, w trakcie którego liczba chromosomów zostaje zredukowana dokładnie do połowy. Taki typ podziału komórkowego nazywamy **mejozą**, od słowa greckiego oznaczającego „pomniejszenie" lub „zmniejszenie".

W tej końcowej części rozdziału omawiamy mechanizm mejozy, uwypuklając różnice między mejozą a mitozą. Genetyczne i biologiczne znaczenie mejozy jest rozważane w rozdz. 9.

Homologiczne chromosomy łączą się w pary w czasie mejozy

Z wyjątkiem chromosomów, które determinują płeć (*chromosomy płciowe*), diploidalna komórka zawiera dwa bardzo podobne warianty każde-



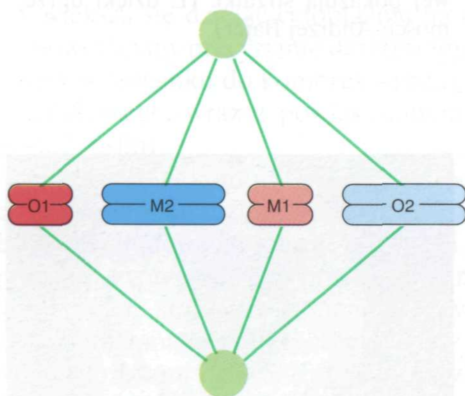
Rys. 17-19. Mikrografia świetlna jaja ludzkiego z plemnikami związanymi na jego powierzchni. Jajo zostało już zapłodnione i zawiera dwa jądra (jedno pochodzące z komórki jajowej i drugie z plemnikowej). Wiele plemników, którym nie udało się zapłodnić komórki jajowej, nadal pozostaje przyczepionych do powierzchni jaja. (Dzięki uprzejmości: Peter Braude)

go chromosomu, jeden od męskiego osobnika rodzicielskiego (chromosom ojcowski) i drugi od rodzica żeńskiego (chromosom matczyny) (patrz rys. 8-2). Jednak te dwa warianty każdego chromosomu nie są genetycznie identyczne, ponieważ zawierają różne wersje wielu genów (jak omówiono w rozdz. 9). Dlatego są zwane **chromosomami homologicznymi** lub **homologami**, co podkreśla, że są podobne, lecz nieidentyczne. Komórka diploidalna u organizmu rozmnażającego się płciowo ma wobec tego dwa podobne zestawy informacji genetycznej. W większości komórek homologi pozostają całkowicie oddzielone jako niezależne chromosomy.

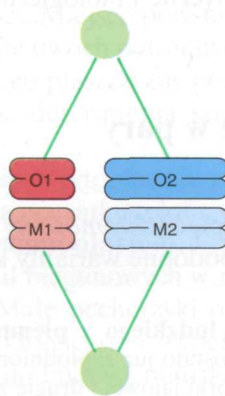
W mitozie, jak omówiliśmy wcześniej, każdy chromosom zostaje zreplikowany i takie podwojone chromosomy ustawiają się w przypadkowym porządku w płytce metafazowej; następnie siostrzane chromatydy oddzielają się od siebie i stają się samodzielnymi chromosomami, a dwie potomne komórki powstałe w wyniku cytokinezy dziedziczą po jednej kopii każdego chromosomu ojcowskiego i jednej kopii każdego chromosomu matczynego. W ten sposób oba zestawy informacji genetycznej zostają bez uszkodzeń przeniesione do obu komórek potomnych, które dlatego pozostają diploidalne i genetycznie identyczne.

Przeciwnie, gdy diploidalne komórki dzielą się mejotycznie, tworzą gamety zawierające tylko połowę pierwotnej liczby chromosomów — mają tylko jeden chromosom każdego typu zamiast pary homologów każdego typu. Stąd każda gameta nabywa albo matczyną, albo ojcowską kopię chromosomu, a nie obie. Ta redukcja jest niezbędna, aby w momencie zapłodnienia, tj. połączenia się dwóch gamet (jaja i plemnika u zwierząt) u embriona doszło do odtworzenia diploidalnej liczby chromosomów. Ponieważ przydział matczynych i ojcowskich chromosomów do gamet jest w czasie mejozy przypadkowy, oryginalne chromosomy matczyne i ojcowskie są tasowane w różnych kombinacjach.

Konieczność zredukowania do połowy liczby chromosomów stwarza dodatkowe wymagania dla mechanizmu podziału komórkowego, co prowadzi do pierwszej istotnej różnicy między mejozą i mitozą. W czasie mejotycznego podziału komórkowego zreplikowane homologiczne chromosomy ojcowskie i matczyne (włączając dwa zreplikowane chromosomy płciowe) ustawiają się parami wzdłuż siebie, zanim zajmą miejsce na wrzecionie (rys. 17-20). Jak zobaczymy, to fizyczne łączenie się w pary homologów pozwala na segregację chromosomów ojcowskiego i matczynego do różnych komórek potomnych. Nadal nie wiadomo, jak chromosomy homologiczne (i dwa chromosomy płciowe) rozpoznają się nawzajem.

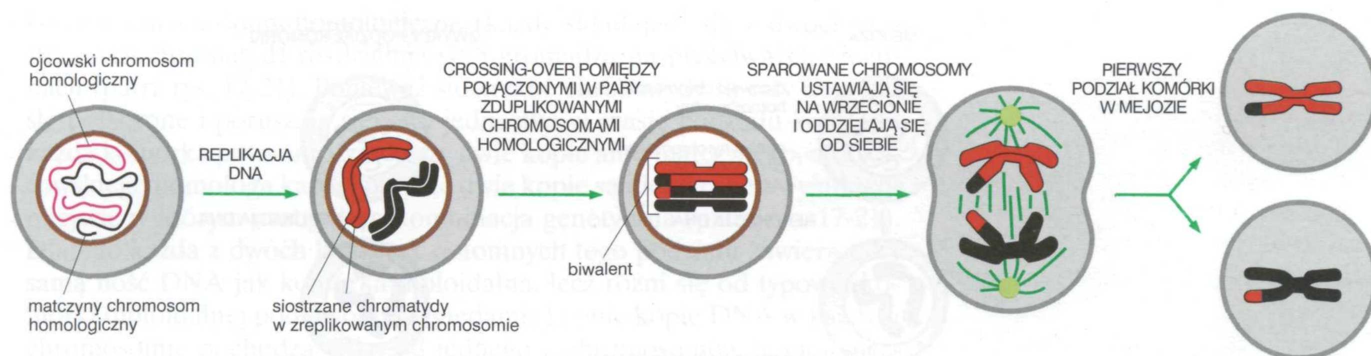


(A) Płytka metafazowa w czasie mitozy: chromosomy homologiczne działają niezależnie



(B) Płytka metafazowa w czasie mejozy: chromosomy homologiczne łączą się w pary

Rys. 17-20. Porównanie metafazy w mitozie i mejozie. W czasie mitozy (A) poszczególne matczyne (M) i ojcowskie (O) chromosomy ustawiają się losowo w płytce metafazowej, natomiast podczas mejozy (B) homologiczne chromosomy matczyne i ojcowskie łączą się w pary jeszcze przed ustawieniem w płytce metafazowej. W obu wypadkach chromosomy uległy replikacji przed ustawieniem w płytce. Wrzeciono zaznaczono kolorem *zielonym*



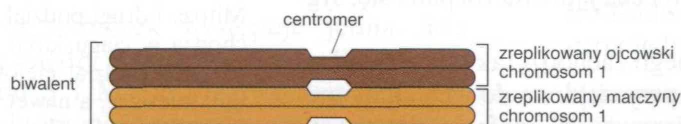
Rys. 17-21. Podział I mejozy. Dla uproszczenia na rysunku przedstawiono tylko jedną parę chromosomów homologicznych, chociaż każda komórka eukariotyczna ma ich więcej niż jedną parę. Po replikacji DNA każdy chromosom składa się z dwóch siostrzanych chromatyd połączonych razem na całej ich długości. Łączenie się w pary zreplikowanych homologicznych chromosomów jest unikatową cechą mejozy. Takie sparowanie chromosomów umożliwia rekombinację genetyczną (crossing-over) pomiędzy homologicznymi chromosomami, co zilustrowano przedstawiając część chromosomu kolorem *czerwonym*, a część kolorem *czarnym* (zjawisko crossing-over wyjaśniono w rozdz. 9). Po zajściu rekombinacji tworzy się wrzeciono mejotyczne, otoczka jądrowa ulega rozpadowi, sparowane chromosomy ustawiają się w płytce metafazowej i zostają odciągnięte przez wrzeciono. Dwa potomne jądra komórkowe powstałe w czasie pierwszego podziału mejotycznego zawierają jeden ze zreplikowanych chromosomów homologicznych

Mejoza obejmuje dwa podziały komórkowe, a nie jeden

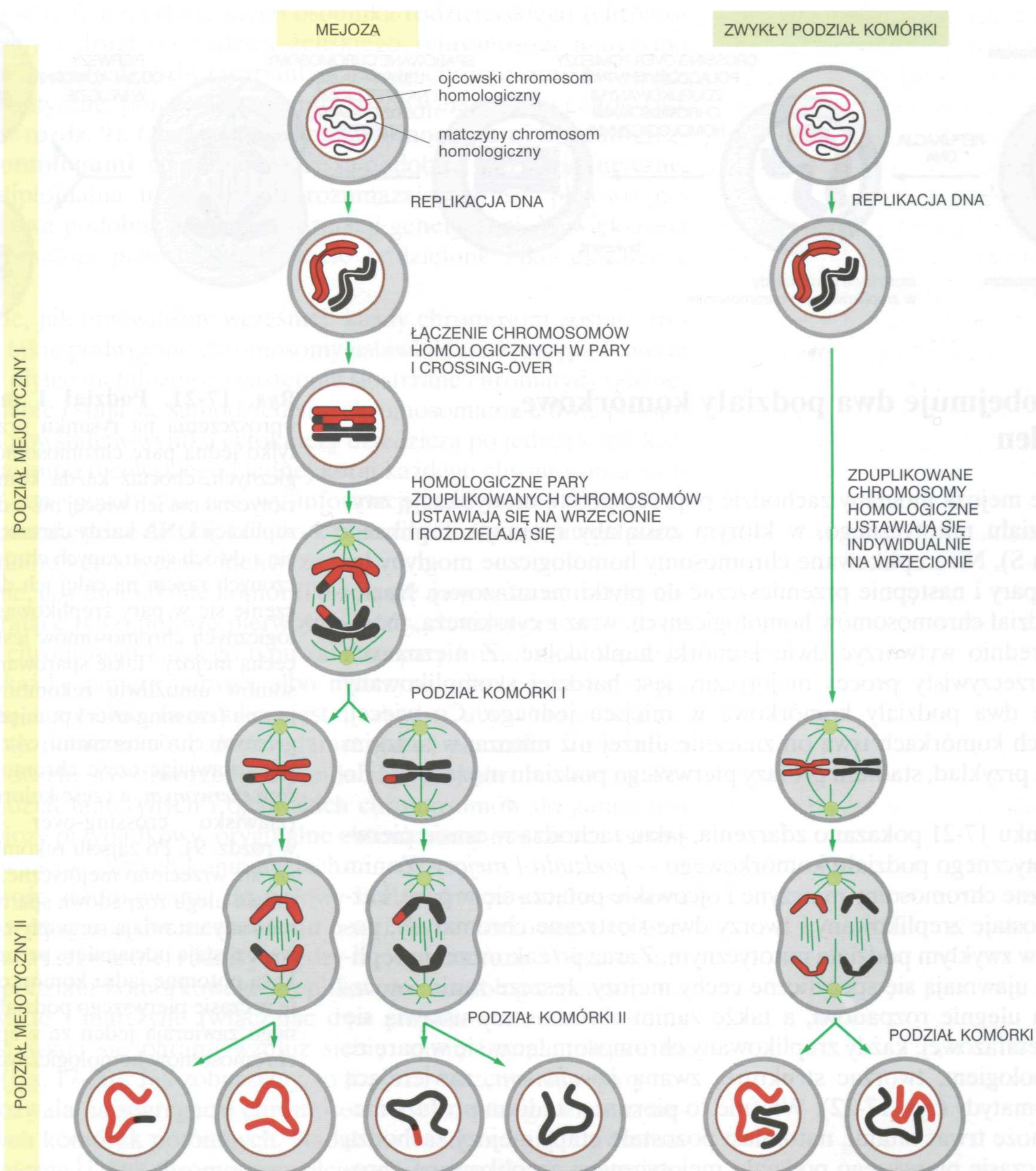
W zasadzie mejoza mogłaby zachodzić poprzez prostą modyfikację zwykłego podziału mitotycznego, w którym zostałaby ominięta replikacja DNA (faza S). Niezreplikowane chromosomy homologiczne mogłyby łączyć się w pary i następnie przemieszczać do płytki metafazowej. Następujący rozdział chromosomów homologicznych, wraz z cytokinezą, mógłby bezpośrednio wytworzyć dwie komórki haploidalne. Z nieznanych powodów rzeczywisty proces mejotyczny jest bardziej skomplikowany i obejmuje dwa podziały komórkowe w miejsce jednego. Co więcej, w niektórych komórkach trwa on znacznie dłużej niż mitoza: w ludzkim oocycie, na przykład, stadium profazy pierwszego podziału może trwać do 50 lat.

Na rysunku 17-21 pokazano zdarzenia, jakie zachodzą w czasie pierwszego mejotycznego podziału komórkowego — *podziału I mejozy*. Zanim homologiczne chromosomy matczyne i ojcowskie połączą się w pary, każdy z nich zostaje zreplikowany i tworzy dwie siostrzane chromatydy, podobnie jak w zwykłym podziale mitotycznym. Zaraz po zakończeniu replikacji DNA ujawniają się specyficzne cechy mejozy. Jeszcze zanim otoczka jądrowa ulegnie rozpadowi, a także zanim chromosomy ustawią się w płytce metafazowej, każdy zreplikowany chromosom łączy się w parę ze swym homologiem, tworząc strukturę, zwaną *biwalentem*, zawierającą cztery chromatydy (rys. 17-22). Właśnie to pierwsze stadium profazy mejotycznej może trwać latami, natomiast pozostałe etapy mejozy zachodzą szybko. W czasie pierwszego podziału mejotycznego zreplikowane chromosomy homologiczne oddzielają się od siebie i są segregowane do oddzielnych komórek potomnych; jednakże siostrzane chromatydy każdego z homologów pozostają razem podczas tego podziału i zachowują się niczym pojedyncza jednostka, tak jak gdyby nie zaszła replikacja chromosomu (patrz rys. 17-21); pozostaną nie rozdzielone aż do drugiego podziału mejotycznego.

W czasie długiej profazy pierwszego podziału mejotycznego zreplikowane chromosomy homologiczne w biwalencie są utrzymywane razem w dokładnym ustawieniu względem siebie poprzez *kompleks synaptemalny*. Kompleks ten składa się z długiego rdzenia białkowego przypominającego drabinę, z dwoma chromosomami homologicznymi ustawionymi



Rys. 17-22. Biwalent. Matczyna i ojcowska kopie chromosomu 1 zostały zreplikowane i następnie połączyły się w parę tworząc biwalent, który składa się z czterech chromatyd. Kinetochory są formowane na centromerach w taki sposób, że na obu siostrzanych chromatydach zreplikowanego chromosomu są zwrócone w tym samym kierunku. Dlatego mikrotubule wrzeciona połączą dwa zreplikowane chromosomy z przeciwnymi biegunami wrzeciona



Rys. 17-23. Porównanie mejozy i mitozy. Podobnie jak na rys. 17-21 przedstawiono tylko jedną parę chromosomów homologicznych. W czasie mejozy, po zreplikowaniu DNA, do wytworzenia haploidalnych gamet są potrzebne dwa podziały jądrowe i komórkowe. Dlatego każda komórka diploidalna, która przechodzi mejozę, produkuje cztery komórki haploidalne, natomiast każda komórka diploidalna, która dzieli się mitotycznie, tworzy dwie komórki diploidalne. Dla uproszczenia na rysunku pominięto etapy telofaz i prometafaz w obu podziałach. Mitoza i drugi podział mejozy zwykle zachodzą w ciągu kilku godzin, natomiast pierwszy podział mejotyczny może trwać dni, miesiące, a nawet lata, ponieważ tak wiele czasu zajmuje w nim profaza

po przeciwnych stronach. Siostrzane chromatydy w każdym chromosomie homologicznym są ściśle upakowane łącznie z ich chromatyną wystającą jako seria pętli po tej samej stronie drabiny białkowej.

Jak omówiono w rozdz. 9, sparowanie chromosomów homologicznych w biwalenty w czasie długiej profazy pierwszego podziału mejotycznego umożliwia rekombinację genetyczną, w trakcie której fragment matczynej chromatydy może zostać wymieniony na odpowiadający mu fragment homologicznej chromatydy ojcowskiej. Ten proces, zwany **crossing-over** (patrz rys. 17-21), jest ważną cechą mejozy. Poprzez wymieszanie genetycznego układu każdego z chromosomów w gametach crossing-over pomaga tworzyć osobniki o nowym zestawie genów. Na końcu długiej profazy pierwszego podziału mejotycznego otoczka jądrowa rozpada się, sygnalizując początek prometafazy.

Reszta pierwszego podziału mejotycznego zachodzi tak jak w zwykłym podziale mitotycznym. Biwalenty zostają przyczepione do wrzeciona mejotycznego i ustawiają się w płytce metafazowej. W anafazie dwa zrepli-

kowane chromosomy homologiczne (każdy składający się z dwóch siostrzanych chromatyd) rozdzielają się i gromadzą na przeciwnych biegunach (patrz rys. 17-21). Ponieważ siostrzane chromatydy są cały czas ściśle połączone i poruszają się jako jednostka w czasie podziału komórki, każda komórka potomna dziedziczy dwie kopie albo matczynego, albo ojcowskiego homologa każdej pary; te dwie kopie są identyczne z wyjątkiem miejsca, w którym nastąpiła rekombinacja genetyczna (patrz rys. 17-21). Dlatego każda z dwóch komórek potomnych tego podziału zawiera taką samą ilość DNA jak komórka diploidalna, lecz różni się od typowej komórki diploidalnej pod dwoma względami: 1) obie kopie DNA w każdym chromosomie pochodzą tylko od jednego z chromosomów homologicznych komórki wyjściowej (z wyjątkiem odcinków, w których zaszła rekombinacja genetyczna); 2) te dwie kopie są dziedziczone jako dwie ściśle zasocjowane chromatydy tak, jak gdyby były nadal pojedynczym chromosomem (patrz rys. 17-21).

Tworzenie ostatecznych gamet następuje w drugim podziale komórkowym, *podziale II mejozy*, który zachodzi bez dalszej replikacji DNA oraz bez wyraźnej interfazy. Tworzy się wrzeciono, chromosomy ustawiają się w jego płaszczyźnie równikowej i siostrzane chromatydy rozdzielają się (jak w zwykłej mitozie), aby utworzyć potomne komórki o haploidalnej zawartości DNA. Stąd można powiedzieć, że mejoza składa się z pojedynczej tury replikacji DNA, po której następują dwa podziały komórkowe, toteż z każdej diploidalnej komórki, która podejmuje mejozę, powstają cztery komórki haploidalne. Mejozę i mitozę porównano na rys. 17-23.

Zdarza się, że proces mejozy przebiega nieprawidłowo i nie dojdzie do rozdziału chromosomów homologicznych — zjawisko to znane jest jako **nondysjunkcja**. W tym wypadku niektórym z powstałych haploidalnych komórek brak jednego chromosomu, natomiast inne mają więcej niż jedną jego kopię. Takie gamety tworzą nienormalne zarodki, z których większość zamiera, choć niektóre niekiedy przeżywają. *Zespół Downa* u człowieka, na przykład, jest wywoływany przez dodatkową kopię chromosomu 21. Jest to rezultatem nondysjunkcji połączonych chromosomów 21 w czasie mejozy, wskutek czego powstaje gameta, która zawiera dwie kopie chromosomu 21 zamiast jednej. Gdy taka nieprawidłowa gameta łączy się z prawidłową w czasie zapłodnienia, powstały zarodek zawiera trzy kopie chromosomu 21 zamiast dwóch.

Pytanie 17-6. Dlaczego dla organizmu byłoby niepożądane wykorzystywanie pierwszych etapów mejozy (aż do końca pierwszego podziału mejotycznego) jako sposobu zwykłego podziału mitotycznego komórek somatycznych?

Streszczenie

- Wszystkie komórki powstają przez podział innych komórek. Bakterie dzielą się przez podział prosty, natomiast komórki eukariotyczne dzielą się w sposób bardziej skomplikowany.
- Eukariotyczny cykl komórkowy składa się z kilku odrębnych faz. Są to: faza S, w czasie której jądrowy DNA zostaje zreplikowany, oraz faza M, podczas której dzieli się jądro (mitoza), a następnie cytoplazma (cytokineza).
- W większości komórek występuje jedna faza przerwy (G_1) między fazami M i S oraz druga (G_2) między fazami S i M. Te przerwy dają komórce więcej czasu, który może przeznaczyć na wzrost.
- Początek fazy M objawia się utworzeniem wrzeciona mitotycznego z mikrotubul. Wrzeciono segreguje potomne chromosomy do przeciwległych biegunów komórki.
- Duże, ograniczone błonami organelle, takie jak retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego, rozpadają się na liczne drobne fragmenty w czasie fazy M, co zapewnia równy ich rozdział do komórek potomnych.
- Centrosomy ulegają duplikacji, zanim jeszcze zostanie zmontowane wrzeciono mitotyczne na początku fazy M. Dwa potomne centrosomy rozdzielają się i przemieszczają do przeciwnych stron jądra, gdzie tworzą dwa bieguny wrzeciona.
- Mikrotubule rosną od centrosomów. Niektóre z nich oddziałują wzajemnie z mikrotubulami

narastającymi od przeciwległego bieguna. W ten sposób powstają biegunowe mikrotubule wrzeciona.

- Gdy otoczka jądrowa rozpadnie się, mikrotubule wrzeciona mogą wnikać w obszar jądra komórkowego. Niektóre z nich chwytają zreplikowane chromosomy, łącząc się z kompleksami białkowymi zwanymi kinetochorami, związanymi z centromerem każdej z siostrzanych chromatyd.
- Mikrotubule z przeciwnych biegunów ciągną każdy chromosom w przeciwnym kierunku, ustawiając chromosomy równikowo we wrzecionie mitotycznym.
- Chromosomy potomne powstają przez nagłe rozdzielenie siostrzanych chromatyd i są przeciągane przez wrzeciono do przeciwległych biegunów. Dwa bieguny również oddalają się od siebie, pogłębiając rozdzielenie dwóch zestawów chromosomów.
- Przemieszczanie chromosomów przez wrzeciono jest napędzane przez białka motoryczne mikrotubul oraz przez polimeryzację i depolimeryzację mikrotubul.
- Otoczka jądrowa jest odtwarzana wokół obu zespołów rozdzielonych chromosomów i tak powstają dwa nowe jądra, na czym kończy się mitoza.
- W komórkach zwierzęcych podział komórkowy kończy się poprzez pierścień kurczliwy zbudowany z filamentów aktynowych i miozynowych, który powstaje w połowie odległości między biegunami wrzeciona. Jego skurcz dzieli cytoplazmę na dwie części. Odmiennie, w komórkach roślinnych podział komórkowy kończy się przez utworzenie wewnątrz komórki nowej ściany komórkowej i to ona dzieli cytoplazmę na dwie części.
- Gamety (plemniki i jaja u zwierząt) powstają w mejozie, wyspecjalizowanym podziale komórkowym, który wytwarza komórki haploidalne z diploidalnych. Komórki haploidalne są niezbędne do rozmnażania płciowego zwierząt, zapewniają bowiem, że liczba chromosomów nie jest stale podwajana po zapłodnieniu.
- Chociaż większość z mechanicznych właściwości mejozy jest podobna do tych w mitozie, zachowanie chromosomów jest odmienne; mejoza tworzy cztery niepodobne genetycznie komórki haploidalne w trakcie dwóch następujących po sobie podziałów komórkowych, natomiast mitoza tworzy dwie genetycznie identyczne komórki diploidalne w czasie pojedynczego podziału komórki.

Hasła

anafaza	cytokineza	kinetochor	profaza
biegun wrzeciona	faza G_1	komórka diploidalna	prometafaza
chromatyda	faza G_2	komórka haploidalna	telofaza
chromosom homologiczny	faza M	mejoza	wrzeciono mitotyczne
(homolog)	faza S	metafaza	
crossing-over	fragmoplast	mitoza	
cykl komórkowy	interfaza	nondysjunkcja	

Pytania

Pytanie 17-7. Które z poniższych twierdzeń są prawdziwe? Uzasadnij swoją odpowiedź.

A. Centrosomy są replikowane niezależnie od chromosomów.

B. Otoczka jądrowa ulega fragmentacji w czasie mitozy. Dlatego zostaje rozdzielona między komórki potomne, podobnie jak inne organelle ograniczone błonami, takie jak retikulum endoplazmatyczne i aparat Golgiego.

C. Dwie siostrzane chromatydy powstają w wyniku replikacji DNA tego samego chromosomu i pozostają połączone w pary, aż do momentu ustawienia w płytce metafazowej.

D. Całkowita zawartość DNA jądrowego w komórce powstałej w drodze mejozy jest połową zawartości DNA komórki powstałej w mitozie.

E. Mikrotubule biegunowe łączą się stykając swymi końcami i dlatego ciągną się od bieguna do bieguna we wrzecionie mitotycznym.

F. Polimeryzacja i depolimeryzacja mikrotubul oraz białka motoryczne mikrotubul są niezbędne do replikacji DNA.

G. Mikrotubule tworzą się w centromerach i następnie przyłączają się do kinetochoru, który jest strukturą w centrosomowym rejonie chromosomu.

Pytanie 17-8. Rozważ następujące twierdzenie: „Wszystkie dzisiejsze komórki powstały przez nieprzerwaną serię podziałów komórkowych, które można prześledzić cofając się aż do pierwszego podziału komórkowego". Czy jest ono całkowicie prawdziwe?

Pytanie 17-9. W przybliżeniu oceń, ile czasu upłynie, nim po-

jedyncza zapłodniona komórka jajowa wytworzy poprzez powtarzające się podziały zbiór komórek o masie 70 kg, jeśli przyjąć, że każda komórka ma masę 1 nanograma tuż po podziale komórkowym, a każdy cykl komórkowy trwa 24 godziny? Dlaczego osiąganie masy 70 kg przez dorastającego człowieka trwa znacznie dłużej?

Pytanie 17-10. Podaj właściwą kolejność następujących zdarzeń zachodzących w czasie podziału komórki:

A. anafaza
B. metafaza
C. prometafaza
D. telofaza
E. faza Księżyca
F. mitoza
G. profaza

Pytanie 17-11. Najkrótsze eukariotyczne cykle komórkowe — trwające krócej nawet od podziałów licznych bakterii — zachodzą u wielu wczesnych embrionów zwierzęcych. Tym podziałom nie towarzyszy znaczący wzrost masy embriona. Jak może do tego dochodzić? Po której z faz cyklu komórkowego można oczekiwać, że będzie najbardziej zredukowana?

Pytanie 17-12. Wyjaśnij znaczenie każdego z wymienionych procesów w podziale komórki bakteryjnej oraz w podziale komórki eukariotycznej.

A. montaż mikrotubul
B. replikacja DNA
C. mejoza
D. mitoza
E. synteza ściany komórkowej
F. wzrost komórki
G. odtworzenie otoczki jądrowej

Pytanie 17-13. Czas życia mikrotubuli w komórce ssaków, od momentu jej utworzenia poprzez polimeryzację do spontanicznego zaniku w wyniku depolimeryzacji, zmienia się w różnych stadiach cyklu komórkowego. W aktywnie rosnącej komórce przeciętny czas życia wynosi 5 minut w interfazie oraz 15 sekund w mitozie. Jeśli przeciętna długość mikrotubuli w interfazie wynosi 20 μm, ile będzie ona wynosić podczas mitozy, gdy przyjmiemy, że szybkość wydłużania w wyniku dodawania podjednostek tubuliny w tych dwóch fazach jest taka sama? Jeśli typowy centrosom w komórce interfazowej ma 100 miejsc nukleacji dla mikrotubul, ilu takich miejsc można się spodziewać w centrosomie komórki w czasie mitozy, przyjmując, że całkowita liczba cząsteczek tubuliny, które polimeryzują w mikrotubulach jest taka sama w obu fazach?

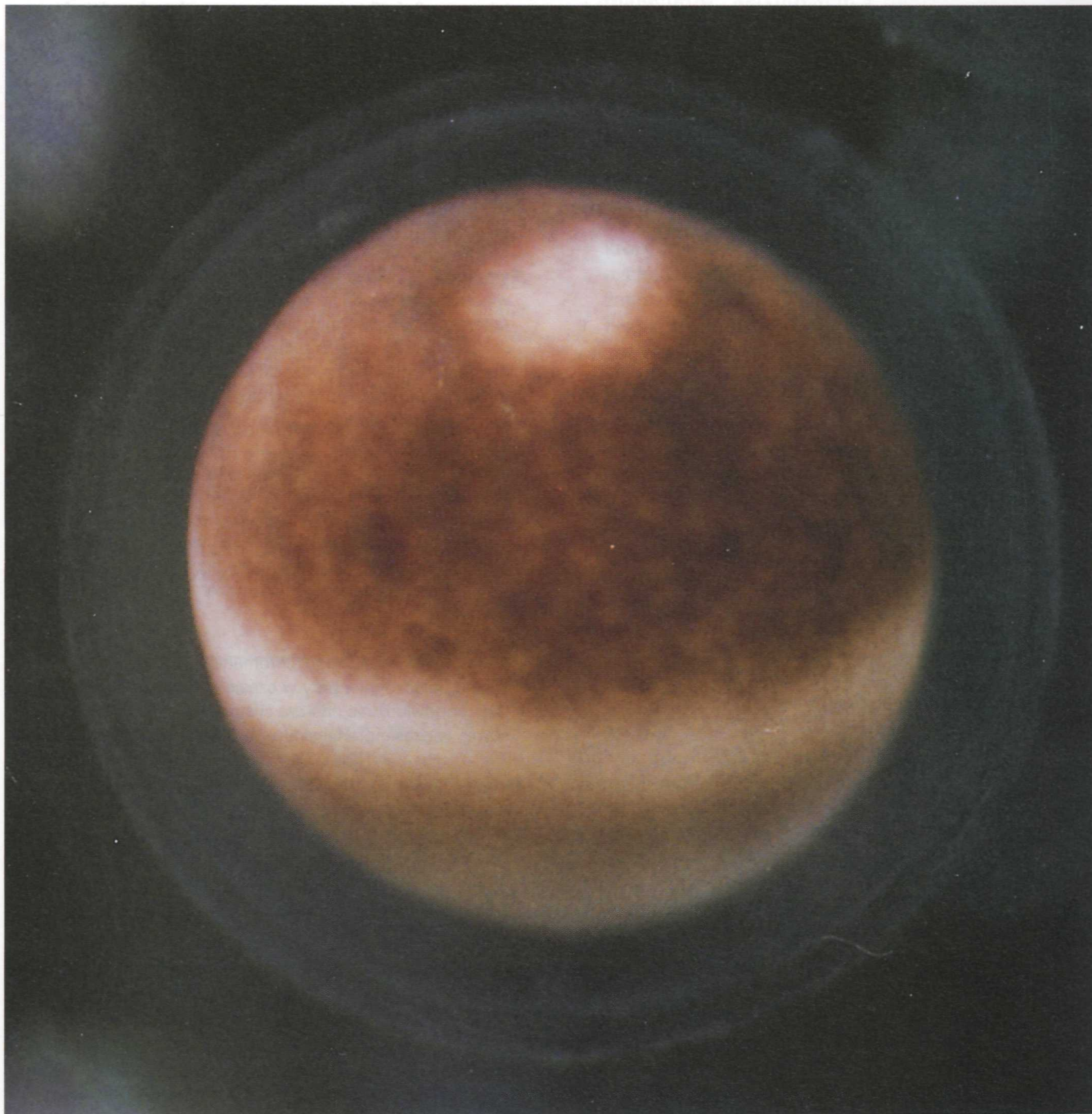
Pytanie 17-14. Co może wywoływać rzadkie pojawianie się dwóch kopii tego samego chromosomu w tej samej komórce potomnej? Jakie będą konsekwencje tego zdarzenia a) w mitozie, b) w mejozie?

Pytanie 17-15. Przeciwciało przeciwko miozynie uniemożliwia ruch cząsteczek miozyny wzdłuż filamentów aktynowych (interakcje aktyny i miozyny opisano w rozdz. 16). Jak sądzisz, w jaki sposób przeciwciała wywierają taki efekt? Jaki może być wpływ wstrzyknięcia tego przeciwciała do komórek a) na ruch chromosomów w anafazie lub b) na cytokinezę. Wyjaśnij odpowiedzi.

Pytanie 17-16. Naszkicuj podstawowe stadia mitozy, wykorzystując panel 17-1 (s. 558–559). Podkoloruj jedną z siostrzanych chromatyd i prześledź jej losy w czasie mitozy i cytokinezy. Jakie zdarzenie przydziela tę chromatydę do danej komórki potomnej? Jeśli już zostanie przydzielona, to czy jej los może zostać odwrócony? Co może wpłynąć na takie przydzielenie?

Pytanie 17-17. Dlaczego chromatydy siostrzane muszą pozostać połączone w pary w czasie I podziału mejotycznego? Czy odpowiedź nie nasuwa ci strategii, którą mógłbyś zastosować w czasie prania skarpetek?

Pytanie 17-18. Ruch chromosomów w kierunku biegunów podczas anafazy A jest związany ze skracaniem mikrotubul. W szczególności, mikrotubule depolimeryzują przy tym końcu, przy którym są przyczepione do kinetochoru. Naszkicuj model, który wyjaśnia, jak mikrotubule mogą się skracać, a zarazem wytwarzać siłę, chociaż pozostają ściśle przyczepione do chromosomu.



Ta olbrzymia kulista komórka jaja żaby *Xenopus* ma ponad 1 mm średnicy. Po zapłodnieniu szybko dzieli się bez okresów wzrostu między podziałami, dając w czasie ok. 7 godzin zarodek żaby złożony z ponad 4000 małych komórek potomnych. Badanie szybkich, wczesnych cykli komórek zarodkowych u *Xenopus* doprowadziło do odkrycia centralnych składników układu kontroli cyklu komórkowego. (Dzięki uprzejmości: Tony Mills)

18

Kontrola cyklu komórkowego i śmierć komórki

UKŁAD KONTROLI CYKLU KOMÓRKOWEGO

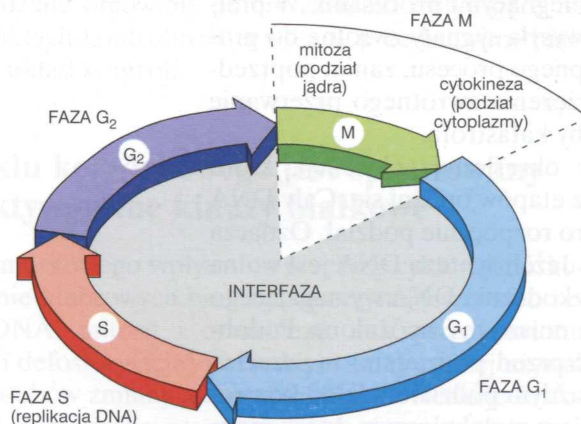
- **Centralny układ kontroli włącza główne procesy cyklu komórkowego**
- **Układ kontroli cyklu komórkowego jest sprawowany przez cyklicznie aktywowane kinazy białkowe**
- **MPF jest kompleksem cyklina–Cdk kontrolującym wejście w fazę M**
- **Kinazy białkowe zależne od cyklin są regulowane nagromadzaniem i rozpadem cyklin**
- **Aktywność Cdk jest dodatkowo regulowana ich fosforylacją i defosforylacją**
- **Różne kompleksy cyklina–Cdk włączają różne etapy cyklu komórkowego**
- **Cykl komórkowy może zostać zatrzymany w G_1 przez białkowe inhibitory Cdk**
- **Komórki mogą zdemontować swój układ kontroli i opuścić cykl komórkowy**

KONTROLA LICZBY KOMÓREK W ORGANIZMIE WIELOKOMÓRKOWYM

- **Proliferacja komórek zależy od sygnałów z innych komórek**
- **Komórki zwierzęce mają zaprogramowane ograniczenie liczby podziałów**
- **Komórki zwierzęce potrzebują sygnałów od innych komórek, by uniknąć programowanej śmierci komórki**
- **Programowana śmierć komórki zachodzi z udziałem śródkomórkowej kaskady proteaz**
- **Komórki nowotworowe omijają „społeczne” kontrole proliferacji i przeżywania komórek**

W cyklu komórkowym są potrzebne dwa rodzaje aktywności: pierwszy do wytworzenia nowych składników rosnącej komórki oraz drugi do przesunięcia tych składników we właściwe miejsca i odpowiedniego rozdzielenia, gdy komórka dzieli się na dwie części, tak jak to opisano w rozdz. 17. Te aktywności *cyklu komórkowego* są pierwszymi, które przyciągają uwagę, podobnie jak maszyny pracujące, które zauważamy odwiedzając fabrykę. Nie mniej ważny jest jednak centralny układ kontroli włączający i wyłączający te aktywności we właściwym okresie oraz koordynacja wszystkich zjawisk prowadzących do uzyskania końcowego efektu. W komórce układ kontroli zapewniający poprawny przebieg cyklu komórkowego oraz regulowanie jego mechanizmu nazywamy *układem kontroli cyklu komórkowego*. Zajmiemy się tym w pierwszej części tego rozdziału.

Jak wspomniano w rozdz. 17, w cyklu komórkowym zdarzenia przebiegają w ustalonej kolejności (patrz panel 17-1, s. 558–559). Gdy rozpocznie się replikacja DNA (faza S), to po niej następuje faza G_2 mitoza i cytokineza (faza M), a następnie faza G_1; wtedy ponownie rozpoczyna się replikacja DNA i tak dalej (rys. 18-1). Układ kontroli cyklu komórkowego we właściwym czasie włącza enzymy i inne białka uczestniczące w kolejnych etapach cyklu, a po ich zakończeniu składniki te dezaktywuje. Gwarantuje również zakończenie każdej fazy cyklu, zanim rozpocznie się następna. Na przykład, układ ten upewnia się, że replikacja DNA została



Rys 18-1. Fazy cyklu komórkowego. Interfaza dotyczy całego cyklu bez fazy M; jest to okres stałego wzrostu komórki i zawiera też fazę S, w czasie której jest replikowany DNA. Jądro, a potem cytoplazma dzielą się w fazie M. Faza G_1 jest przerwą (ang. gap) między fazą M i fazą S; G_2 jest przerwą między fazą S i fazą M

zakończona, zanim rozpocznie się mitoza, oraz że mitoza została zakończona, zanim komórka rozdzieli się na dwie potomne. Również pilnuje, aby następna faza replikacji DNA nie rozpoczęła się, zanim komórka nie dokończy mitozy i powiększy się do odpowiednich rozmiarów.

Układ kontroli uwzględnia również stan otoczenia komórki. W organizmie wielokomórkowym najważniejsze jest, by układ kontroli odpowiadał na sygnały z innych komórek, np. sygnały stymulujące podziały, w sytuacji gdy potrzeba więcej komórek. Tak więc układ kontroli cyklu komórkowego reguluje liczbę komórek w tkankach; gdy układ źle funkcjonuje, może powstać nowotwór. W drugiej części tego rozdziału opiszemy dokładniej, w jaki sposób jest regulowana liczba komórek. Przekonamy się, że zależy to nie tylko od podziałów komórek, ale również od ich zdolności przeżywania bądź śmierci w procesie nazywanym *programowaną śmiercią komórki*.

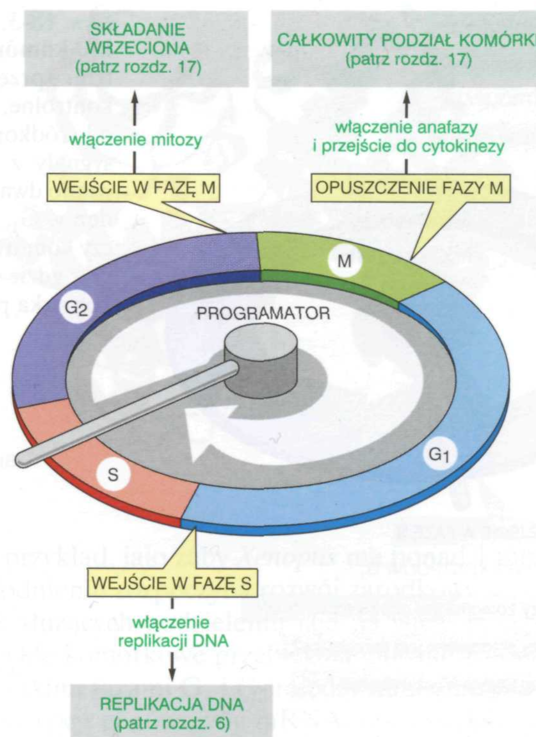
Układ kontroli cyklu komórkowego

Przez wiele lat biolodzy komórki zajmowali się syntezą DNA, mitozą i cytokinezą, ale nie mieli pojęcia, w jaki sposób procesy te są kontrolowane. *Układ kontroli cyklu komórkowego* był „czarną skrzynką" w komórce. Nie było nawet oczywiste, czy istnieje oddzielny układ kontroli, czy też cykl komórkowy w pewien sposób sam się kontroluje. Przełomem było odkrycie kluczowych białek układu kontrolującego i zrozumienie, że różnią się one od składników pracujących w cyklu komórkowym, enzymów i innych białek przeprowadzających podstawowe procesy replikacji DNA, segregacji chromosomów itp. Wpierw rozważymy podstawowe zasady działania układu kontroli cyklu komórkowego, a potem przedstawimy skladniki białkowe układu kontroli i ich współdziałanie we włączaniu różnych faz cyklu komórkowego.

Centralny układ kontroli włącza główne procesy cyklu komórkowego

Układ kontroli cyklu komórkowego działa podobnie jak układ kontrolujący pralkę automatyczną. Pralka funkcjonuje w serii etapów: pobierania wody, mieszania z detergentem, prania bielizny, płukania jej i wirowania w celu wysuszenia. Te podstawowe procesy prania są analogiczne do podstawowych procesów cyklu komórkowego — replikacji DNA, mitozy itd. W obu przypadkach centralny programator włącza każdy proces sekwencyjnie (rys. 18-2). Programator jest regulowany w punktach krytycznych cyklu sprzężeniem zwrotnym z aktualnie biegnącymi procesami. W pralce np. czujnik monitoruje poziom wody i wysyła sygnały zwrotne do programatora, by zapobiec rozpoczęciu następnego procesu, zanim poprzedni nie został ukończony. Bez takiego sprzężenia zwrotnego przerwanie bądź opóźnienie jednego z procesów byłoby katastrofą.

Zdarzenia cyklu muszą zachodzić w określonej sekwencji, która powinna być zachowana, nawet gdy jeden z etapów opóźni się. Cały DNA jądrowy musi być zreplikowany, zanim jądro rozpocznie podział. Oznacza to, że cała faza S musi poprzedzać fazę M. Jeżeli synteza DNA jest wolna albo zostaje zatrzymana (np. z powodu uszkodzenia DNA wymagającego reparacji), mitoza i podział komórki także muszą być opóźnione. Podobnie większość komórek podwaja wielkość przed podziałem; w przeciwnym razie komórki zmniejszałyby się po każdym podziale. Układ kontrolujący cykl komórkowy osiąga to hamowaniem molekularnym, które może



Rys. 18-2. Kontrola cyklu komórkowego. Układ kontroli cyklu komórkowego włącza podstawowe procesy, takie jak replikacja DNA, mitoza i cytokineza. Przez analogię do pralki, w układ kontroli cyklu komórkowego wrysowano programator, który obraca się jak wskazówka zegara, włączając podstawowe procesy, gdy osiągnie właściwe punkty na zewnętrznej tarczy

zatrzymać cykl w różnych **punktach kontrolnych** (ang. **checkpoints**). W ten sposób układ kontrolujący nie włącza następnego etapu cyklu przed zakończeniem poprzedniego.

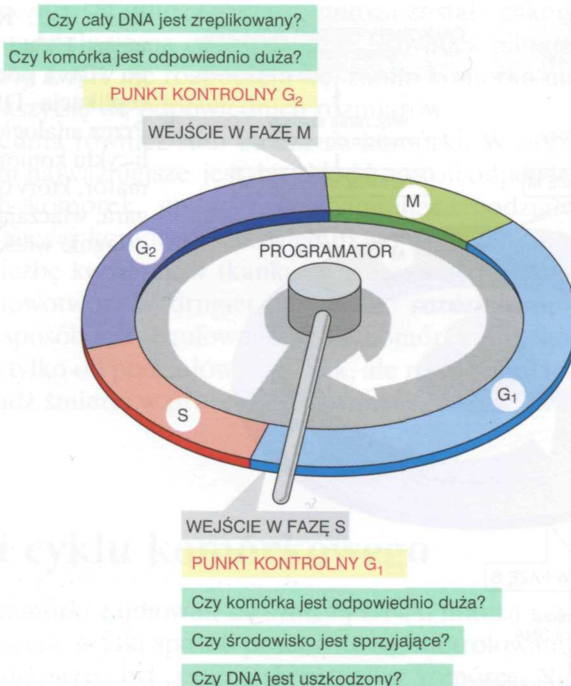
Układ kontroli w większości komórek ma punkt kontrolny wielkości komórki, zatrzymujący cykl aż do momentu, gdy komórka osiągnie odpowiednie wymiary. W fazie G_1 sprawdzenie wielkości pozwala zatrzymać układ, by komórka dorosła, gdy jest to konieczne, zanim włączy rozpoczęcie replikacji DNA. Wzrost komórki zależy od dostarczenia jej z otoczenia substancji odżywczych i innych czynników, a punkt kontrolny G_1 informuje również komórkę, że otoczenie sprzyja proliferacji, zanim wejdzie ona w fazę S. Drugi punkt kontrolny wielkości jest w G_2 i pozwala zatrzymać układ, zanim komórka rozpocznie mitozę. Dodatkowo punkt kontrolny G_2 informuje, że replikacja DNA została zakończona jeszcze przed wejściem w mitozę (rys. 18-3).

Punkty kontrolne są ważne jeszcze z innego powodu: są to w cyklu komórkowym punkty, w których następuje regulacja sygnałami pochodzącymi od innych komórek, takimi jak czynniki wzrostu i inne sygnałowe cząsteczki spoza komórki. Mogą one sprzyjać podziałom bądź hamować proliferację. W tym rozdziale omówimy potem czynniki wpływające na decyzje w opisanych punktach kontrolnych, a wpierw przedstawimy białka sprawujące centralny układ kontroli.

Pytanie 18-1. W G_1 cyklu komórkowego jest punkt, w kórym komórka, nim przejdzie do następnego etapu, sprawdza, czy ma już odpowiednią wielkość. Sugestie o możliwym mechanizmie działania tego punktu opiera się na obserwacji komórek z nieprawidłową liczbą kopii ich genomu. Wydaje się ogólną regułą dla danego typu komórek, że ich wielkość jest proporcjonalna do zawartej w nich liczby zestawów chromosomów. Pamiętając o tym, zaproponuj mechanizm, którym komórka dokonuje pomiaru swej wielkości w G_1.

Układ kontroli cyklu komórkowego jest sprawowany przez cyklicznie aktywowane kinazy białkowe

Układ kontroli cyklu komórkowego wpływa na przebieg cyklu komórkowego przez fosforylowanie kluczowych białek rozpoczynających albo regulujących replikację DNA, mitozę i cytokinezę. Jak przedstawiono w rozdz. 5, fosforylacja (i defosforylacja) jest jednym z najczęściej używanych przez komórkę sposobów zmiany aktywności białek. Reakcje fosforylacji kontrolujące cykl komórkowy są prowadzone przez zestaw swo-



Rys. 18-3. Dwa punkty kontrolne w cyklu komórkowym. O tym, czy układ kontroli przejdzie przez pewne punkty kontrolne, decydują: sprzężenie zwrotne od śródkomórkowych zdarzeń cyklu oraz sygnały z otoczenia komórki. Przedstawiono dwa ważne punkty sprawdzania: jeden w G_1, gdzie układ kontroli decyduje, czy komórka przejdzie do fazy S, i drugi w G_2, gdzie układ kontroli decyduje, czy komórka przejdzie do mitozy

istych kinaz białkowych, enzymów katalizujących przeniesienie grupy fosforanowej z ATP na odpowiednią resztę aminokwasową białka docelowego. Wpływ fosforylacji można szybko odwrócić usunięciem grupy fosforanowej (defosforylacja), reakcją prowadzoną innym zestawem enzymów, fosfatazami białkowymi (co omówiono w rozdz. 5).

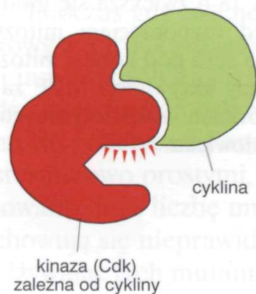
Kinazy białkowe układu kontroli cyklu komórkowego są obecne w komórkach proliferujących podczas całego cyklu. Są jednak aktywowane tylko w odpowiednim okresie cyklu, po czym szybko tracą aktywność. Stąd aktywność każdej z tych kinaz cyklicznie zwiększa się i zmniejsza. Niektóre kinazy białkowe np. są aktywne pod koniec fazy G_1 i odpowiadają za wprowadzenie komórki w fazę S; inne stają się aktywne tuż przed fazą M i pozwalają na wprowadzenie komórki w mitozę.

Gdy założymy, że kinazy białkowe układu kontroli cyklu komórkowego są obecne przez cały cykl, to chcielibyśmy wiedzieć, jak aktywność tych enzymów jest włączana i wyłączana w odpowiednim okresie? Częściowo zależy to od innego zestawu składników białkowych układu kontroli — od cyklin. Cykliny same nie mają aktywności enzymatycznej, ale muszą się przyłączyć do kinaz cyklu komórkowego, zanim kinazy te mogą zyskać aktywność enzymatyczną. Stąd kinazy układu kontroli cyklu komórkowego są nazywane *kinazami białkowymi zależnymi od cyklin* albo **Cdk** (ang. **c**yclin-**d**ependent protein **k**inases) (rys. 18-4). Nazwa cyklin pochodzi stąd, że przeciwnie niż poziom Cdk, ich stężenie zmienia się cyklicznie w cyklu komórkowym.

Pomoc cyklin w aktywacji Cdk we właściwym czasie jest dobrze zilustrowana przykładem kompleksu cyklina–Cdk odpowiedzialnego za wprowadzenie komórek w mitozę.

MPF jest kompleksem cyklina–Cdk kontrolującym wejście w fazę M

Kompleks cyklina–Cdk wprowadzający komórki w fazę M odkryto podczas badania podziałów jaj żaby. Zapłodnione jaja wielu zwierząt dobrze nadają się do biochemicznych badań cyklu komórkowego, bo są bardzo





Rys. 18-4. Dwa składniki białkowe kompleksu cyklina–Cdk. (A) Kinaza zależna od cykliny (Cdk) jest enzymem katalizującym fosforylację białek, natomiast cyklina jest białkiem regulatorowym koniecznym do aktywności enzymu Cdk. Aktywny kompleks fosforyluje kluczowe białka w komórce potrzebne do włączenia określonych etapów cyklu komórkowego. (B) Trójwymiarowa budowa kompleksu cyklina–Cdk nazywanego MPF. Kontroluje on wejście komórki w fazę M. (B adaptowano z: P. D. Jeffrey et. al., *Nature* 376: 313–320, 1995)

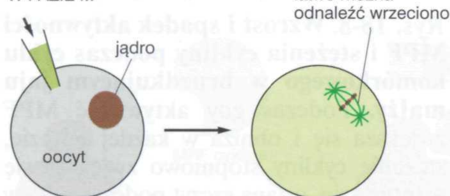
duże i szybko się dzielą. Na przykład, jajo żaby *Xenopus* ma ponad 1 mm średnicy (rys. 18-5). Po zapłodnieniu rozpoczyna rozwój zarodkowy serią szybkich cykli podziałowych służących podzieleniu jaja na wiele mniejszych komórek. Te szybkie cykle komórkowe przebiegają głównie z powtarzaną fazą S i fazą M, z krótkimi fazami G_1 i G_2 między nimi albo w ogóle bez nich. Nie ma transkrypcji genów: cały mRNA, jak i większość białek potrzebnych do tego wczesnego okresu rozwoju zarodkowego są już nagromadzone w bardzo dużym jaju podczas rozwoju oocytu w jajniku matki. W tych wczesnych cyklach podziałowych (nazywanych *podziałami bruzdkowania)* nie zachodzi wzrost komórek, a komórki zarodka dzielą się synchronicznie.

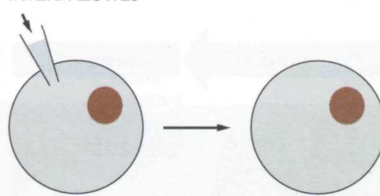
Z jaj żaby w określonym stadium cyklu komórkowego można przygotować wyciąg reprezentatywny dla tego okresu. Biologiczną aktywność tego wyciągu można badać przez wstrzyknięcie go do oocytu *Xenopus* (niedojrzałego prekursora nie zapłodnionego jaja) i obserwowanie jego wpływu na cykl komórkowy. Oocyt *Xenopus* jest wygodnym obiektem sprawdzania aktywności kierującej komórkę do fazy M, bo ma zakończoną replikację DNA i jest zatrzymany tuż przed fazą M pierwszego podziału mejotycznego (co opisano w rozdz. 17). Oocyt jest więc w stadium cyklu odpowiadającym fazie G_2 cyklu mitotycznego.

W takich doświadczeniach stwierdzono, że wyciąg z jaja w fazie M natychmiast wprowadza oocyt w fazę M, natomiast cytoplazma bruzdkującego jaja innych faz cyklu nie ma tego działania. W chwili odkrycia biochemiczna natura i mechanizm działania czynnika wywołującego aktywność fazy M nie były znane, a aktywność nazwano *czynnikiem MPF* (ang. M-phase promoting factor) (rys. 18-6).

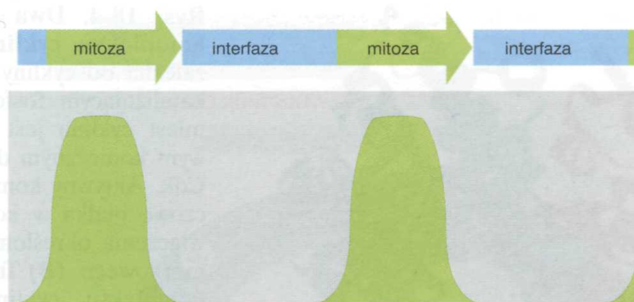


Rys. 18-5. Dojrzałe jajo *Xenopus*. Ta olbrzymia komórka jest gotowa do zapłodnienia. (Zdjęcie otrzymano dzięki uprzejmości: Tony Mills)





Rys. 18-6. Doświadczenie przedstawiające aktywność MPF. (A) Do oocytu *Xenopus* wstrzykuje się cytoplazmę pobraną z jaja *Xenopus* w fazie M. Wyciąg komórkowy wprowadza oocyt w fazę M pierwszego podziału mejotycznego, czego przejawem jest powiększone jądro, chromosomy i tworzące się wrzeciono. (B) Jeżeli cytoplazmę pobierze się z bruzdkującego jaja w interfazie, nie powoduje ona wejścia oocytu w fazę M. Stąd uważa się, że wyciąg użyty w (A) musi zawierać jakiś aktywny czynnik włączający fazę M (MPF)



Rys. 18-7. Oscylacja aktywności MPF podczas cyklu komórkowego w zarodku *Xenopus*. Aktywność określana testem opisanym na rys. 18-6 zwiększa się gwałtownie tuż przed rozpoczęciem mitozy i szybko spada do zera pod koniec mitoz. Takie same zmiany aktywności MPF zachodzą w komórkach eukariotycznych, od drożdży do człowieka

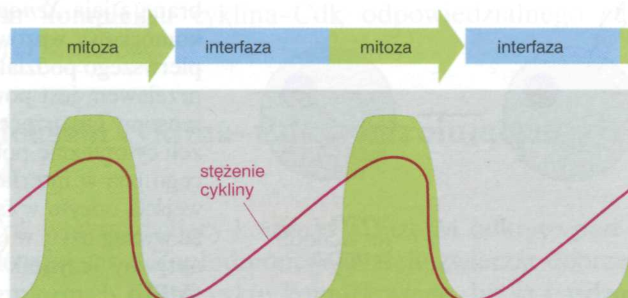
Przez sprawdzenie cytoplazmy różnych stadiów cyklu komórkowego testem przedstawionym na rys. 18-6 obserwowano, że aktywność MPF oscyluje w każdym cyklu komórkowym: zwiększa się gwałtownie tuż przed rozpoczęciem mitozy i zmniejsza szybko do zera pod koniec mitozy (rys. 18-7).

Gdy w końcu oczyszczono MPF, stwierdzono, że czynnik ten zawiera jedną kinazę białkową konieczną do jego aktywności. Kinaza fosforylując kluczowe białka powoduje kondensację chromosomów, rozpad otoczki jądrowej oraz rozpad mikrotubul cytoszkieletu i ich reorganizację we wrzeciono podziałowe. Na przykład, rozpad otoczki jądrowej zachodzi przez demontaż jądrowej laminy, biegnących pod otoczką jądrową filamentów laminy. Jak opisano w rozdz. 17, kinaza MPF fosforyluje białka laminy powodując demontaż filamentu (patrz rys. 17-14). Podobnie kinaza fosforyluje białka towarzyszące mikrotubulom, co zmienia właściwości mikrotubul tak, że tworzą wrzeciono podziałowe.

Jednak kinaza wchodząca w skład MPF nie może działać samotnie. Jak wcześniej wspomniano, aby funkcjonować, musi ona mieć przyłączoną swoistą cyklinę. Uważa się, że przyłączona cyklina kieruje kinazę do białek, które mają być fosforylowane. Cykliny wykryto w innym rodzaju doświadczeń, co zaraz opiszemy.

Kinazy białkowe zależne od cyklin są regulowane nagromadzaniem i rozpadem cyklin

Biochemiczne doświadczenia, które doprowadziły do wykrycia cyklin, były prowadzone na bruzdkujących jajach małży i podobnie jak doświadczenia z wstrzykiwaniem wyciągów do jaj żab umożliwiły wykrycie czynnika MPF. **Cyklinę** początkowo identyfikowano jako białko, którego stężenie stopniowo zwiększało się w interfazie, a potem raptownie malało do zera w fazie M komórki. Powtarzało się to w każdym cyklu komórkowym (rys. 18-8). Ponieważ cyklina nie ma aktywności enzymatycznej, jej funkcja w cyklu była początkowo niejasna. Przełom nastąpił, gdy stwierdzono, że cyklina jest składnikiem MPF oraz jest konieczna do kinazowej aktywności MPF, czyli *mitotycznej Cdk*. MPF jest białkowym kompleksem złożonym z dwóch podjednostek — regulatorowej, którą jest cyklina, oraz katalitycznej, którą jest



Rys. 18-8. Wzrost i spadek aktywności MPF i stężenia cykliny podczas cyklu komórkowego w bruzdkującym jaju małży. Podczas gdy aktywność MPF zwiększa się i obniża w każdej mitozie, stężenie cykliny stopniowo zwiększa się w interfazie, osiąga szczyt podczas mitozy i gwałtownie zmniejsza się pod jej koniec. Stężenie kinazy MPF nie zmienia się w czasie cyklu komórkowego; to tylko jej aktywność podlega zmianom

mitotyczna Cdk. Po wykryciu składników MPF wyizolowano inne typy cyklin i Cdk, których stężenia lub aktywności zwiększają się i zmniejszają się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

Podczas gdy biochemicy identyfikowali białka regulujące cykl komórkowy w zarodkach żaby i małży, genetycy zajmujący się drożdżami wybrali inny sposób analizowania układu kontroli cyklu komórkowego. Drożdże są jednokomórkowymi grzybami. Są one organizmami preferowanymi do genetycznej analizy w biologii komórki, ponieważ są eukariotami stosunkowo prostymi, dzielącymi się prawie tak szybko jak bakterie. Izolowano dużą liczbę mutantów drożdży, które pozostają sklejone bądź zachowują się nieprawidłowo w określonych okresach cyklu komórkowego. Używając tych mutantów wykryto wiele genów uczestniczących w kontroli cyklu komórkowego. Okazało się, że niektóre z tych genów kodują białka cyklin i Cdk o podobnej sekwencji aminokwasów i funkcji jak ich odpowiedniki u żab i małży. Wkrótce też podobne geny zidentyfikowano w komórkach człowieka.

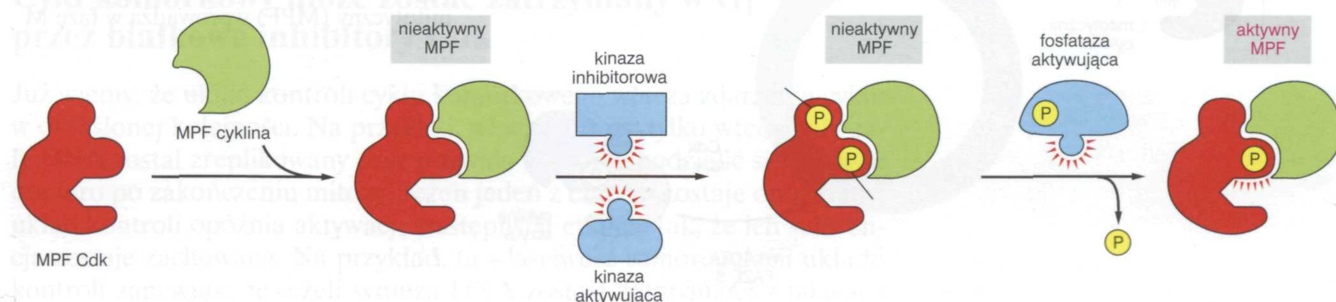
Wiele genów kontroli cyklu komórkowego tak nieznacznie zmieniło się podczas ewolucji, że geny człowieka doskonale funkcjonują w komórkach drożdży, np. drożdże, których własny gen określonej *cdk* bądź *cykliny* jest upośledzony, nie dzielą się, lecz zaczynają normalne podziały, gdy kopię odpowiedniego genu człowieka sztucznie wprowadzi się do upośledzonej komórki. Na pewno nawet Darwin byłby zaskoczony tak oczywistym dowodem, że ludzie i drożdże są kuzynami. Mimo bilionów lat ewolucji w różnych kierunkach, wszystkie komórki eukariotyczne (drożdże, zwierzęta, rośliny) używają w zasadzie tych samych cząsteczek do kontroli zdarzeń cyklu komórkowego.

Regulacja stężenia cyklin ma ważny udział w synchronizacji zjawisk cyklu komórkowego. Na przykład, synteza składnika MPF — cykliny — zaczyna się bezpośrednio po podziale i trwa stale podczas interfazy. Cyklina gromadzi się, stąd jej stężenie stopniowo zwiększa się i określa chwilę rozpoczęcia mitozy; jego późniejsze gwałtowne zmniejszenie się rozpoczyna wyjście z mitozy (patrz rys. 18-8). Nagły spadek stężenia cykliny podczas mitozy jest spowodowany szybkim zniszczeniem cykliny w układzie proteolitycznym zależnym od ubikwityny. Wiele cząsteczek ubikwityny jest kowalencyjnie dołączonych do każdej cząsteczki cykliny, co kieruje ją do degradacji w proteosomach (co omówiono w rozdz. 7). Ta ubikwitynacja cykliny jest pośrednim wynikiem aktywacji kinazy MPF. Aktywacja MPF rozpoczyna proces prowadzący z opóźnieniem do ubikwitynacji i degradacji cyklin, co z kolei wyłącza kinazę.

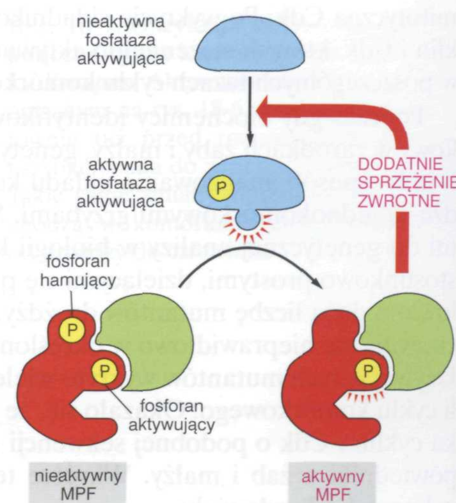
Aktywność Cdk jest dodatkowo regulowana ich fosforylacją i defosforylacją

Stężenie cykliny zwiększa się stopniowo w interfazie, natomiast aktywność kinazy MPF włącza się gwałtownie pod koniec interfazy (patrz rys.

Rys. 18-9. Aktywacja MPF. Kompleks MPF cyklina–Cdk, jest nieaktywny enzymatycznie, gdy powstanie. Potem Cdk jest fosforylowana w miejscach potrzebnych do jej aktywności oraz innych miejscach — hamujących tę aktywność. Do tej chwili MPF nie jest aktywny. Jak pokazano na rysunku, MPF w końcu jest aktywowany przez fosfatazę, która usuwa inaktywującą grupę fosforanową. Nie wiadomo, jak jest kontrolowany czas tej aktywacji



Rys. 18-10. Zaktywowany MPF pośrednio aktywuje dalsze MPF. Gdy MPF zostanie już zaktywowany, kinaza MPF fosforyluje i tym samym aktywuje dalsze cząsteczki fosfatazy, które aktywują więcej cząsteczek MPF. Chociaż tego nie pokazano, zaktywowany MPF również hamuje kinazę inhibitorową przedstawioną na rys. 18-9 i tym samym zwiększa aktywację MPF. Tymi sposobami zaktywowany MPF pośrednio aktywuje więcej MPF tak, że aktywacja MPF zachodzi wybuchowo



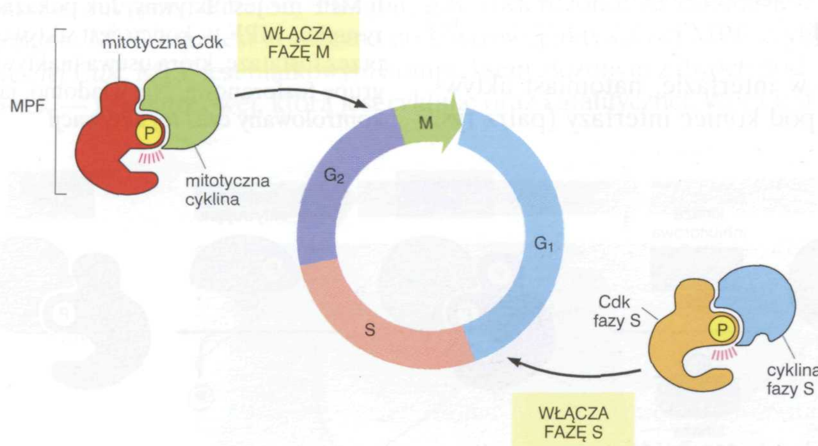
18-8). Cyklina jest konieczna do aktywacji kinazy MPF, chociaż wymaga to bliższego omówienia. Sama kinaza musi zostać ufosforylowana w jednym lub kilku miejscach i zdefosforylowana w innych, zanim stanie się enzymatycznie aktywna. Usunięcie hamujących grup fosforanowych przez swoistą fosfatazę białkową jest etapem aktywującym kinazę pod koniec interfazy (rys. 18-9). Aktywny kompleks cyklina–Cdk może aktywować następne kompleksy cyklina–Cdk, jak przedstawiono to na rys. 18-10. To dodatnie sprzężenie zwrotne powoduje nagły, wybuchowy wzrost aktywności kinazy MPF wprowadzając szybko komórkę w fazę M.

Pytanie 18-2. Wstrzyknięcie do nie zapłodnionego oocytu żaby małej ilości cytoplazmy izolowanej z komórki w fazie mitozy powoduje wejście tego oocytu w fazę M. Pobrana następnie próbka jego cytoplazmy wstrzyknięta do drugiego oocytu również wprowadza ten ostatni w mitozę. Proces ten można powtarzać wielokrotnie, aż nie pozostanie już w zasadzie nic z wyjściowej próbki białek, a mimo to cytoplazma pobrana z ostatniego w serii tak traktowanych jaj nadal pobudza z niezmienną wydajnością wejście komórek w fazę M. Wyjaśnij tę niezwykłą obserwację.

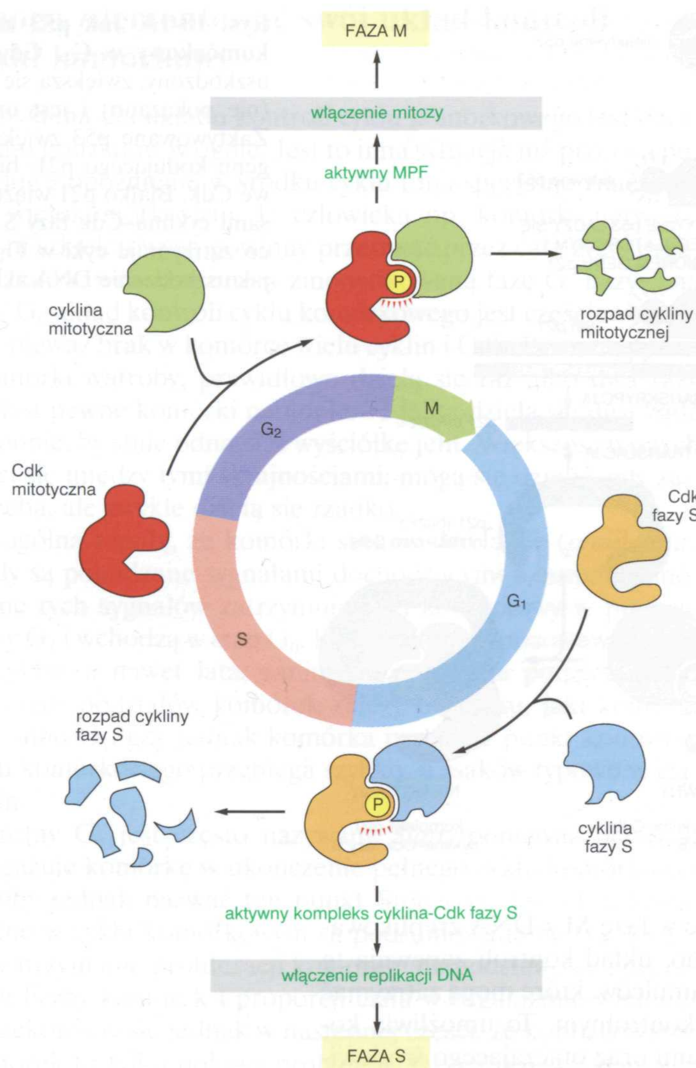
Różne kompleksy cyklina–Cdk włączają różne etapy cyklu komórkowego

Istnieje wiele odmian cyklin i u większości *Eukaryota* wiele różnych Cdk jest zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego. Różne komleksy cyklina–Cdk włączają różne etapy cyklu komórkowego. Podczas gdy MPF będący kompleksem cyklina–Cdk działa w G_2 włączając początek fazy M, inne cykliny, nazywane *cyklinami fazy S*, wiążą się z cząsteczkami Cdk pod koniec fazy G_1, włączając początek fazy S (rys. 18-11). Jeszcze inne cykliny, nazywane *cyklinami G_1* działają w fazie G_1 wcześniej; wiążą się one z cząsteczkami Cdk, co wspomaga tworzenie i aktywację kompleksów cyklina–Cdk fazy S i kieruje komórkę do fazy S. Potem przekonamy się, że tworzenie kompleksów cyklina–Cdk w komórkach zwierzęcych zwykle zależy od pozakomórkowych czynników wzrostowych pobudzających komórki do podziału.

Stężenie różnych typów cyklin zwiększa się, a potem gwałtownie maleje na skutek degradacji na drodze ubikwitynacji w określonym czasie cyklu komórkowego. Wzrost stężenia każdego typu cykliny wspomaga aktywację jej partnerskiej Cdk, a nagły jego spadek przywraca tę Cdk do sta-



Rys. 18-11. Dwa kompleksy cyklina–Cdk, które działają na różne etapy w cyklu komórkowym. Kompleks cyklina–Cdk fazy S przeprowadza komórkę do fazy S, natomiast kompleks cyklina–Cdk mitotyczny (MPF) wprowadza w fazę M



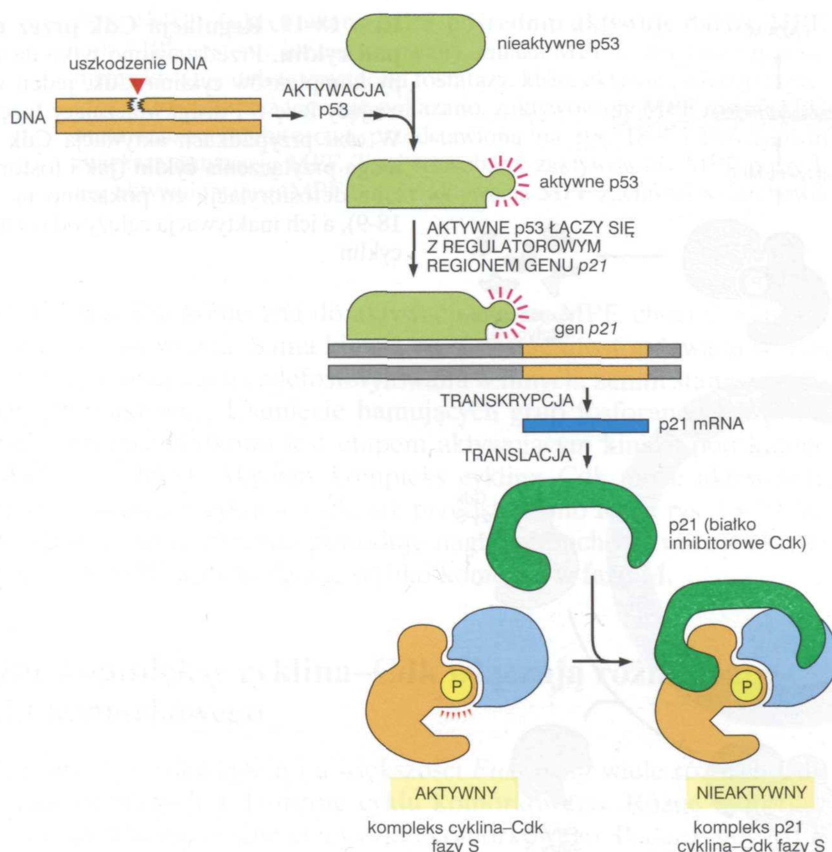
Rys. 18-12. Regulacja Cdk przez rozpad cyklin. Przedstawiono tylko dwa typy kompleksów cyklina–Cdk, jeden włączający fazę S i drugi włączający fazę M. W obu przypadkach aktywacja Cdk wymaga przyłączenia cyklin (jak i fosforylacji i defosforylacji, co pokazano na rys. 18-9), a ich inaktywacja zależy od rozpadu cyklin

nu nieaktywnego (rys. 18-12). Powolne gromadzenie się cyklin, aż do krytycznego poziomu, jest jednym ze sposobów pomiaru odstępów czasu między jednym etapem cyklu a następnym w układzie kontroli cyklu komórkowego.

Podobnie jak w przypadku kinazy MPF, również każda inna Cdk jest odpowiednio fosforylowana i defosforylowana tak, aby mogła działać. Każdy rodzaj kompleksu cyklina–Cdk działa na różny zestaw białek docelowych w komórce. W wyniku tego każdy typ kompleksów włącza inny etap przejściowy cyklu.

Cykl komórkowy może zostać zatrzymany w G_1 przez białkowe inhibitory Cdk

Już wiemy, że układ kontroli cyklu komórkowego włącza zdarzenia cyklu w określonej kolejności. Na przykład, włącza mitozę tylko wtedy, gdy cały DNA został zreplikowany oraz pozwala komórce podzielić się na dwie dopiero po zakończeniu mitozy. Jeżeli jeden z etapów zostaje opóźniony, układ kontroli opóźnia aktywację następnych etapów tak, że ich sekwencja zostaje zachowana. Na przykład, ta właściwość samoregulacji układu kontroli zapewnia, że jeżeli synteza DNA zostaje zatrzymana z jakiegoś



Rys. 18-13. Jak p53 zatrzymuje cykl komórkowy w G_1. Gdy DNA zostanie uszkodzony, zwiększa się ilość białka p53 (nie pokazano) i jest ono aktywowane. Zaktywowane p53 zwiększa transkrypcję genu kodującego p21, białko inhibitorowe Cdk. Białko p21 wiąże się z kompleksami cyklina–Cdk fazy S i inaktywuje je, co zatrzymuje cykl w G_1. Nie wiadomo, jak uszkodzenie DNA aktywuje p53

powodu w fazie S, to komórka nie wejdzie w fazę M z DNA zreplikowanym tylko w połowie. Jak już wspomniano, układ kontroli zapewnia tę precyzję przez działanie molekularnych hamulców, które mogą zatrzymać cykl komórkowy w określonym punkcie kontrolnym. To umożliwia komórce monitorowanie jej wewnętrzego stanu oraz otaczającego środowiska przed kontynuacją cyklu (patrz rys. 18-3).

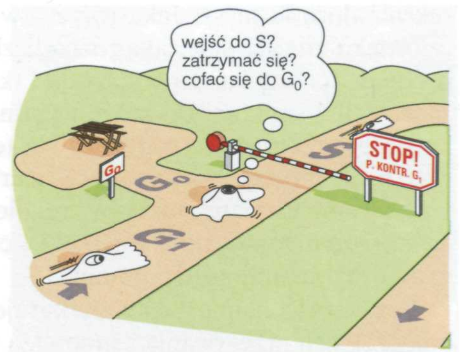
Większość mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zahamowanie biegu cyklu komórkowego w punktach kontrolnych jest słabo poznanych. W niektórych przypadkach są za to odpowiedzialne swoiste **białkowe inhibitory Cdk**; blokują one powstawanie bądź aktywność jednego albo kilku kompleksów cyklina–Cdk. Jeden z lepiej poznanych punktów kontrolnych zatrzymuje cykl komórkowy w G_1 po uszkodzeniu DNA, co zapobiega replikacji przez komórkę uszkodzonego DNA. Uszkodzenie DNA powoduje nie poznanym dotąd mechanizmem zwiększenie stężenia i aktywności białka regulatorowego genów, nazwanego białkiem **p53**. Zaktywowane białko p53 zwiększa transkrypcję genu kodującego białkowy inhibitor Cdk, nazywanego *p21*. To zwiększa stężenie białka p21, które wiąże się z kompleksami cyklina–Cdk fazy S, odpowiedzialnymi za wprowadzenie komórki do fazy S i blokuje ich działanie (rys. 18-13). Zatrzymanie cyklu komórkowego w G_1 daje komórce czas na reperację uszkodzonego DNA, zanim zostanie on zreplikowany. Gdy brak jest białka p53 albo jest ono nieaktywne, zachodzi nieograniczona replikacja uszkodzonego DNA, co zwiększa częstość mutacji i możliwości pojawienia się komórek nowotworowych. Mutacje genu *p53*, które pozwalają dzielić się komórkom z uszkodzonym DNA, stanowią ważny element w rozwoju większości nowotworów u człowieka, o czym powiemy później.

Komórki mogą zdemontować swój układ kontroli i opuścić cykl komórkowy

Najbardziej radykalna dla układu kontroli cyklu komórkowego jest decyzja o zatrzymaniu podziałów w ogóle. Jest to inna sytuacja niż przerwa powodująca chwilowe opóźnienie w środku cyklu i ma specjalne znaczenie w organizmie wielokomórkowym. U człowieka np. komórki nerwowe i komórki mięśni szkieletowych powinny przetrwać przez całe życie organizmu bez podziałów; wchodzą one w zmodyfikowaną fazę G_1 nazywaną G_0 (G zero). W G_0 układ kontroli cyklu komórkowego jest częściowo zdemontowany, ponieważ brak w komórce wielu cyklin i Cdk. Pewne typy komórek, np. komórki wątroby, prawidłowo dzielą się raz albo dwa razy w roku, natomiast pewne komórki nabłonkowe jelita dzielą się dwa bądź więcej razy dziennie, by stale odnawiać wyściółkę jelit. Większość naszych komórek mieści się między tymi skrajnościami: mogą się dzielić, gdy zajdzie taka potrzeba, ale zwykle dzielą się rzadko.

Wydaje się ogólną regułą, że komórki ssaków dzielą się (*proliferują*) tylko wtedy, gdy są pobudzane sygnałami dochodzącymi z innych komórek. Pozbawione tych sygnałów zatrzymują cykl komórkowy w punkcie kontrolnym fazy G_1 i wchodzą w stan G_0. Komórki mogą pozostawać w G_0 przez dni, tygodnie, a nawet lata, zanim się ponownie podzielą. Stąd zmienność częstości podziałów komórek zależy od czasu, jaki komórki pozostają w G_0 albo G_1; gdy jednak komórka przejdzie punkt kontrolny G_1, reszta cyklu komórkowego przebiega szybko, u ssaków typowo w ciągu 12–24 godzin.

Punkt kontrolny G_1 jest często nazywany *Start*, ponieważ przejście przez niego angażuje komórkę w ukończenie pełnego cyklu komórkowego. Lepiej byłoby jednak nazwać ten punkt Stop (rys. 18-14). Główne punkty kontrolne w cyklu komórkowym są podsumowane na rys. 18-15. Rozpoczęcie i zatrzymanie proliferacji komórek ma podstawowe znaczenie dla kontroli liczby komórek i proporcji ciała w organizmie wielokomórkowym. Przekonamy się jednak w następnej części, że kontrolowanie podziałów komórek to tylko połowa problemu. Drugą połowę stanowią różne ważne kontrole określające, czy komórka będzie żyła, czy też popełni samobójstwo.



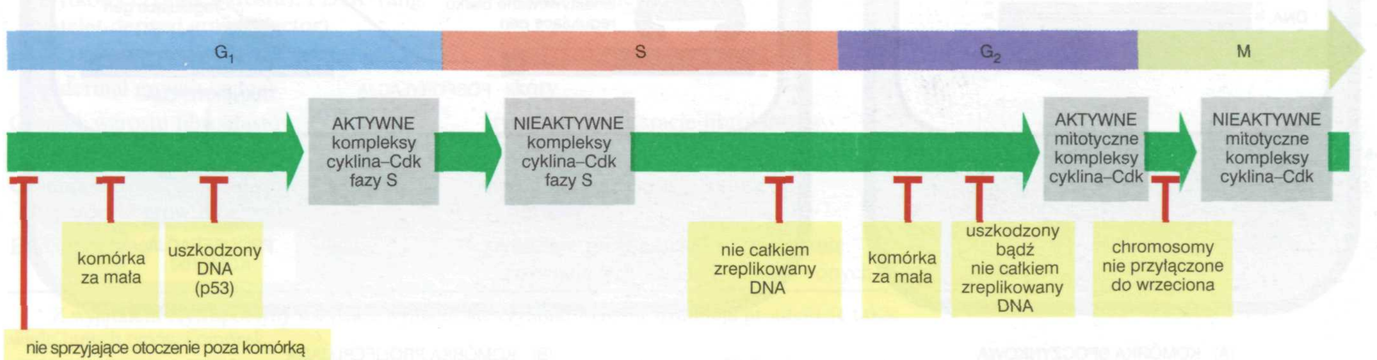
Rys. 18-14. Decyzje w punkcie kontrolnym G_1. Komórka może zdecydować się na przejście cyklu, chwilowe zatrzymanie go do poprawy warunków albo wyjście z cyklu do fazy G_0

Pytanie 18-3. Jak myślisz, dlaczego komórki wypracowały w ewolucji specjalny stan G_0 do wyjścia z cyklu komórkowego, a nie zatrzymują cyklu po prostu w fazie G_1 w punkcie kontrolnym G_1?

Kontrola liczby komórek w organizmie wielokomórkowym

Zapłodnione jajo myszy i zapłodnione jajo człowieka mają podobne rozmiary, a jednak dorosła mysz jest znacznie mniejsza od dorosłego człowieka. Ta różnica wielkości ciała zależy głównie od różnicy liczby komórek: dorosły człowiek jest zbudowany ze znacznie większej liczby komó-

Rys. 18-15. Podsumowanie niektórych punktów kontrolnych cyklu komórkowego. *Czerwone T* zaznaczają w układzie kontroli cyklu komórkowego potencjalne miejsca sprawdzające stopień zaawansowania systemu kontrolującego cykl komórkowy wynikający albo z przebiegu procesów śródkomórkowych nie zakończonych albo zaburzonych, albo z nie sprzyjającego środowiska otaczającego komórkę (zaznaczono kolorem *żółtym*). Punkt kontrolny w fazie M zapewnia, że wszystkie chromosomy są ułożone we wrzecionie, zanim rozpocznie się anafaza, podczas której chromosomy potomne rozdzielą się i przesuną do przeciwległych biegunów wrzeciona (co omówiono w rozdz. 17)



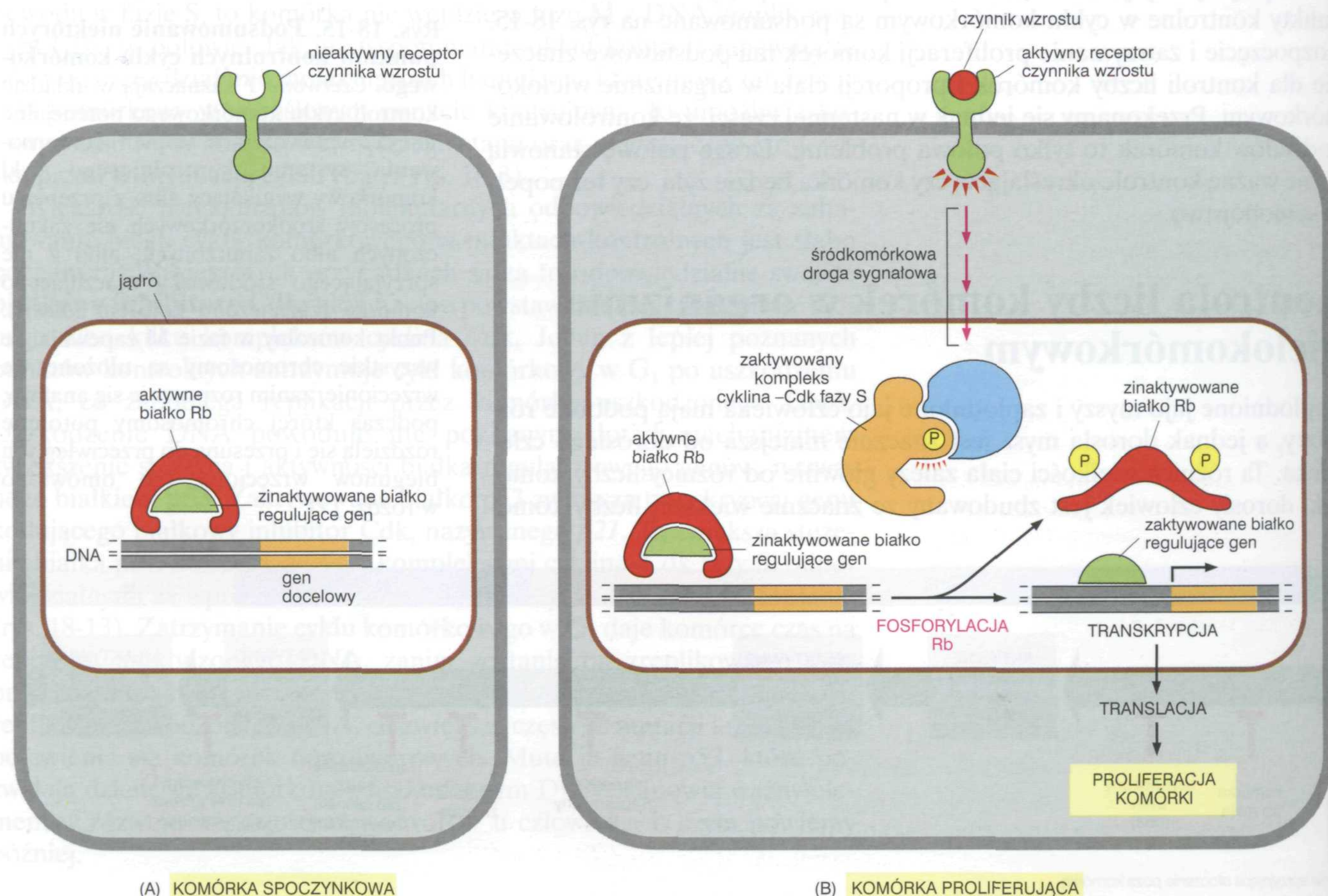
rek niż dorosła mysz. Jaka różnica w kontroli zachowania się komórek człowieka i myszy daje taką różną liczbę komórek? Ten sam podstawowy problem dotyczy każdego narządu i tkanki pojedynczego osobnika. Jakie zachowanie się komórki może wyjaśnić długość tułowia słonia czy wielkość jego mózgu bądź wątroby? Na te pytania w zasadzie nie ma odpowiedzi, ale można je zasugerować. Zarówno proliferacja komórek, jak ich przeżywanie i śmierć muszą być regulowane sygnałami z innych komórek ciała (o czym mówiono w rozdz. 15), co ma zarazem związek z wewnętrznymi programami każdej komórki.

W tej części najpierw przedyskutujemy normalną kontrolę proliferacji komórek, ich przeżywania i śmierci, a potem zastanowimy się, jak błędna regulacja tych procesów może doprowadzić do powstania nowotworu.

Proliferacja komórek zależy od sygnałów z innych komórek

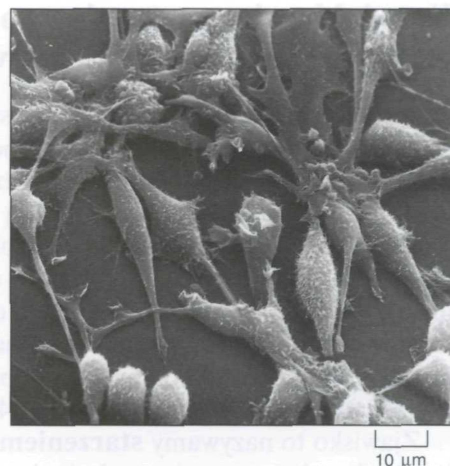
Organizmy jednokomórkowe takie jak bakterie i drożdże mają tendencję, by rosnąć i dzielić się tak szybko, jak to jest możliwe. Ich szybkość proliferacji zależy głównie od dostępności substancji odżywczych w środowisku. Natomiast komórki organizmu wielokomórkowego są wyspecjalizowanymi członkami wysoce zorganizowanej społeczności, a ich proliferacja musi być kontrolowana. Pojedyncza komórka dzieli się tylko wtedy, gdy nowa komórka jest potrzebna organizmowi — ze względu na jego wzrost albo żeby zastąpić utraconą komórkę. Tak więc do proliferacji komórki zwierzęcej nie wystarczą substancje odżywcze. Musi ona jeszcze otrzymać pobudzający sygnał chemiczny od innych komórek, zwykle od sąsiadów.

Rys. 18-16. Uproszczony model przedstawiający, jak czynniki wzrostu pobudzają proliferację komórki. (A) Przy braku czynników wzrostu defosforylowane białko Rb utrzymuje w stanie nieaktywnym swoiste białka regulujące geny. Te białka są konieczne do pobudzenia transkrypcji genów kodujących białka uczestniczące w proliferacji komórki. (B) Czynniki wzrostu łączą się z powierzchniowymi receptorami i aktywują śródkomórkowe drogi sygnałowe, które prowadzą do powstania i aktywacji wcześniej wspomnianych kompleksów cyklina–Cdk fazy G_1. Kompleksy te fosforylują i tym samym inaktywują białko Rb. Uwolnione białka regulujące geny aktywują transkrypcję genów docelowych, co prowadzi do podziałów



Takie działanie pozwala uniknąć użycia mechanizmów hamowania śródkomórkowego, które ograniczałoby wzrost komórki i blokowało przebieg cyklu komórkowego.

Ważnym przykładem hamowania, które normalnie „trzyma w szachu" proliferację komórki jest *białko retinoblastoma (Rb)*, pierwszy raz zidentyfikowane w badaniach rzadkiego nowotworu oka u dzieci nazywanego retinoblastoma. W tym schorzeniu brak jest białka Rb bądź jest ono nieprawidłowe. W jądrze wszystkich komórek kręgowców jest dużo białka Rb. Wiąże się ono z określonymi białkami regulującymi geny, zapobiegając pobudzeniu transkrypcji genów koniecznych do proliferacji. Na przykład zewnątrzkomórkowe sygnały, *czynniki wzrostu* pobudzające proliferację komórki powodują aktywację opisanych już kompleksów cyklina–Cdk fazy G_1. Fosforylują one białko Rb zmieniając jego konformację tak, że uwalnia ono związane przez siebie białka regulujące geny. Wtedy białka te mogą aktywować geny konieczne do przebiegu proliferacji komórki (rys. 18-16).



Rys. 18-17. Skaningowa mikrografia elektronowa proliferujących w hodowli komórek ssaków. Są to fibroblasty szczura rosnące w obecności surowicy cielęcej, króra zawiera czynniki wzrostu stymulujące komórki do podziałów. Kuliste komórki u dołu mikrografii zaokrągliły się przygotowując do podziału (Dzięki uprzejmości: Guenter Albrecht-Buehler)

Sygnałami pobudzającymi, które przełamują hamulce proliferacji komórek, są głównie białka — **czynniki wzrostu**. Te wydzielane białka sygnałowe są wiązane przez receptory powierzchni komórki, czym aktywują śródkomórkowe drogi sygnałowe (omówione w rozdz. 15) stymulujące wzrost i podział komórki. Większość czynników wzrostu zidentyfikowano i opisano badaniem ich wpływu na komórki rosnące w hodowli (rys. 18-17). Jednym z najwcześniej zidentyfikowanych w ten sposób czynników wzrostu był *czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi*, czyli *PDGF* (ang. **p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor). Jego wpływy są typowe dla wielu innych czynników wzrostu. Gdy krew krzepnie (np. w ranie), płytki krwi zawarte w skrzepie zostają pobudzone do uwolnienia PDGF, który wiąże się z receptorową kinazą tyrozynową (co omówiono w rozdz. 15) na przeżywających komórach rany. Pobudza to komórki do proliferacji i gojenia rany. Podobnie, jeżeli część wątroby zostaje utracona podczas zabiegu chirurgicznego, albo w wyniku ostrego urazu, komórki wątroby i inne wytwarzają białko nazwane *czynnikiem wzrostu hepatocytów*, wspomagające stymulację przeżywających komórek wątrobowych do proliferacji.

Większość komórek zwierzęcych wymaga do podziałów w hodowli swoistej kombinacji wielu czynników wzrostu. Stosunkowo mała liczba czynników wzrostu może służyć w różnych kombinacjach do selektywnej regulacji proliferacji wielu typów komórek w organizmie zwierzęcia. Niektóre białkowe czynniki wzrostu i ich działanie przedstawiono w tab. 18-1.

Tabela 18-1. Niektóre białkowe czynniki wzrostu i ich działanie

Czynnik	Typowe działanie*
Czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (płytkowy czynnik wzrostu), PDGF (ang. platelet-derived growth factor)	stymuluje proliferację komórek tkanki łącznej
Epidermalny czynnik wzrostu, EGF (ang. epidermal growth factor)	stymuluje proliferację komórek skóry
Czynnik wzrostu fibroblastów, FGF (ang. fibroblast growth factor)	stymuluje proliferację fibroblastów
Czynnik wzrostu hepatocytów, HGF (ang. hepatocyte growth factor)	stymuluje proliferację komórek wątroby
Erytropoetyna	stymuluje proliferację i różnicowanie rozwijających się krwinek czerwonych

* Z wyjątkiem erytropoetyny wszystkie wymienione czynniki wzrostu stymulują proliferację także wielu innych typów komórek.

Komórki zwierzęce mają zaprogramowane ograniczenie liczby podziałów

Nawet w obecności czynników wzrostu prawidłowe komórki zwierzęce w hodowli nie kontynuują wzrostu bez końca. Te typy komórek, które utrzymują zdolność do podziałów przez całe życie zwierzęcia, gdy pozostają w jego organizmie, zwykle przestają się dzielić po określonej liczbie podziałów w hodowli. Na przykład fibroblasty pobrane z płodu ludzkiego zanim przestaną się dzielić, przechodzą ok. 80 podziałów nawet wtedy, gdy mają wystarczająco dużo pożywienia, czynników wzrostu i miejsca do podziałów. Te zdolności komórek są jednak różne w zależności od wieku osoby, od której pobrano komórki. Fibroblasty pobrane od dorosłej 40-letniej osoby zatrzymują podziały już po ok. 40 cyklach.

Zjawisko to nazywamy **starzeniem się komórki** odpowiednio do starzenia się całego organizmu. Jednak ta analogia nie jest pewna. Ponieważ w hodowli fibroblasty zarodka myszy przestają się namnażać po 30 podziałach, jest możliwe, że starzenie się komórki może pomagać w wyznaczeniu wielkości ciała. Przypuszcza się, że mysz jest dlatego mniejsza niż my, gdyż jej komórki stają się niewrażliwe na pobudzenie czynnikami wzrostu już po mniejszej liczbie cykli podziałowych.

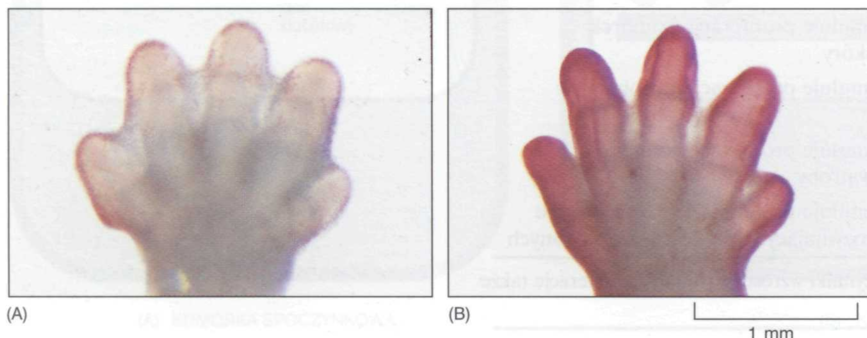
Mechanizmy zatrzymujące cykl w komórkach rozwijających się bądź dojrzałych pozostają dotąd tajemnicą, chociaż prawdopodobnie bierze w tym udział nagromadzenie białek hamujących Cdk i utrata Cdk. Gdy lepiej zrozumiemy molekularne mechanizmy ograniczające zwykle proliferację komórek, może będzie łatwiej ustalić biologiczne znaczenie takich zjawisk jak starzenie komórki i może również w końcu dowiemy się, dlaczego jesteśmy więksi od myszy.

Pytanie 18-4. Poza gromadzeniem inhibitorów Cdk i utratą Cdk dyskutowaną w tekście, zasugeruj jakikolwiek inny mechanizm, który umożliwiłby komórce „znać swój wiek" i przez to pomógł jej ograniczać liczbę następnych podziałów.

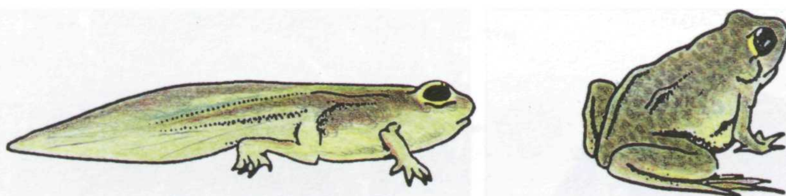
Komórki zwierzęce potrzebują sygnałów od innych komórek, by uniknąć programowanej śmierci komórki

Komórki zwierzęce potrzebują sygnałów od innych komórek nie tylko do proliferacji, lecz też do przeżycia. Pozbawione takich **czynników przeżycia** komórki aktywują śródkomórkowy program samobójczy i giną w procesie nazywanym programowaną śmiercią komórki. Ta konieczność otrzymywania od innych komórek sygnałów do przeżycia pomaga w utrzymaniu komórek tylko wtedy, gdy są one potrzebne i tam, gdzie są potrzebne.

W tkankach rozwijających się i dojrzałych zadziwia częstość programowanej śmierci komórek. Na przykład w rozwijającym się układzie nerwowym kręgowców ponad połowa komórek nerwowych zwykle obumiera wkrótce po ukształtowaniu się. U zdrowego człowieka w każdej godzinie biliony komórek giną w szpiku kostnym i jelicie. Utrata tylu komórek wydaje się rozrzutnością, szczególnie że większość ich jest zdrowa w chwili, gdy zostają uśmiercone. Czemu służy ta masowa śmierć komórek?



Rys. 18-18. W rozwijającej się łapie myszy programowana śmierć komórki rzeźbi palce. (A) Łapę zabarwiono barwnikiem swoiście znakującym (na kolor *czerwony*) komórki, w których zachodzi programowana śmierć. Ta śmierć komórek usuwa tkankę między rozwijającymi się palcami, jak widać to dzień później w łapie (B). (Z: M. D. Jacobson et at., *J. Cell Biol.* 133: 1041–1051, 1996)



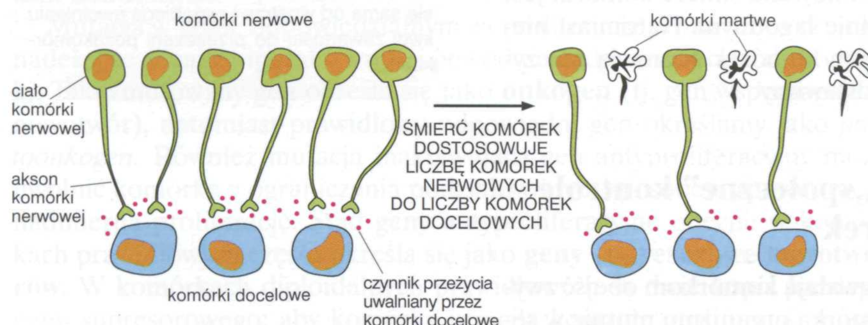
Rys. 18-19. **Programowana śmierć komórek zachodzi podczas metamorfozy kijanki w żabę.** Gdy kijanka zmienia się w żabę, w komórkach ogona kijanki jest włączona programowana śmierć, co prowadzi do utraty ogona. Wszystkie zmiany zachodzące podczas metamorfozy, również włączenie programowanej śmierci komórek w ogonie, są pobudzane wzrostem stężenia we krwi hormonu tarczycy

W niektórych przypadkach odpowiedzi są jasne. Na przykład przez programowaną śmierć komórek nasze ręce i stopy są rzeźbione podczas rozwoju zarodkowego. Początkowo pojawiają się one jako struktury podobne do łopaty, a dopiero potem poszczególne palce rąk i nóg są oddzielane, w miarę jak między nimi giną komórki (rys. 18-18). W innych przypadkach komórki giną, gdy struktury przez nie tworzone nie są potrzebne. Gdy kijanka przekształca się w żabę (metamorfoza), komórki ogona giną, a ogon niepotrzebny już żabie zanika (rys. 18-19). W jeszcze innych przypadkach śmierć komórek pomaga w regulacji liczby komórek. Na przykład w rozwijającym się układzie nerwowym śmierć komórek dostosowuje liczbę komórek nerwowych do liczby komórek docelowych wymagających unerwienia. Komórki nerwowe są w zarodku wytwarzane w nadmiarze i potem konkurują o ograniczone ilości czynników przeżycia wydzielanych przez komórki docelowe, z którymi się kontaktują. Komórki nerwowe otrzymujące wystarczającą ilość czynników przeżycia żyją, a inne giną (rys. 18-20).

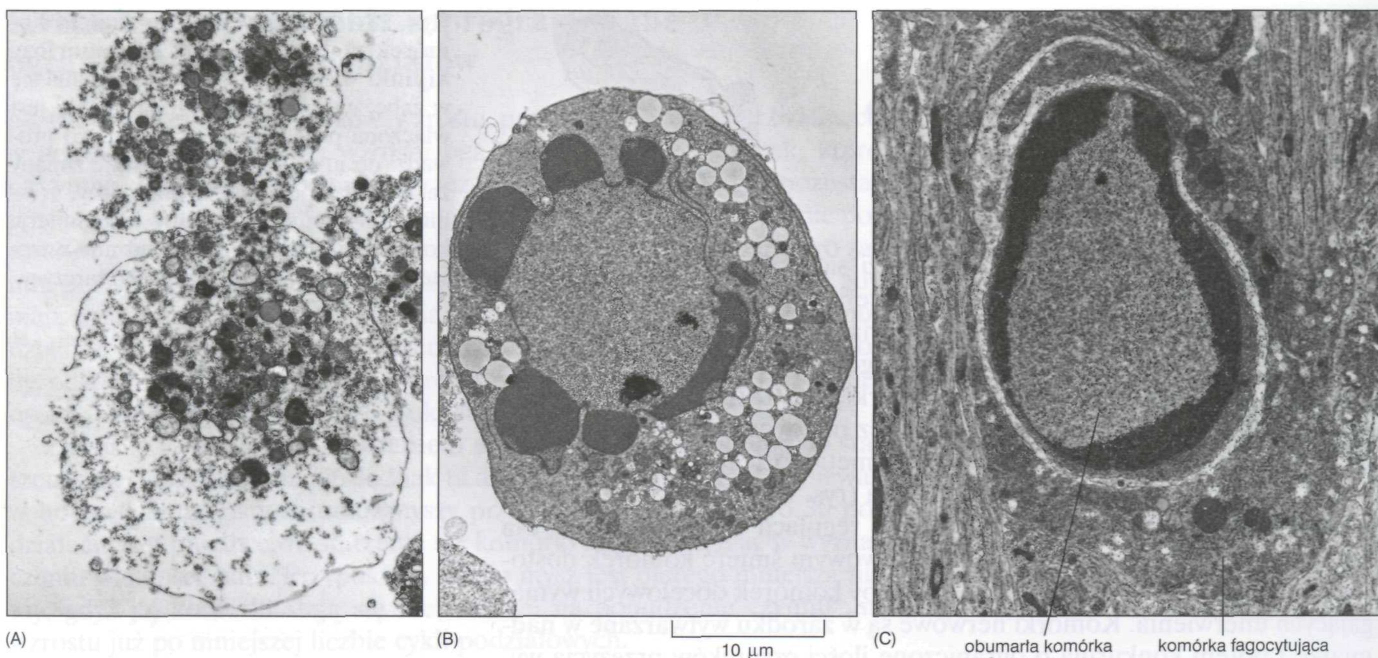
W dojrzałych tkankach śmierć komórek równoważy proliferację, by zapobiec rośnięciu narządów bądź ich kurczeniu się. Jak już wspomniano, jeżeli usunie się część wątroby u dorosłego szczura, proliferacja komórek wątroby wzrasta, by uzupełnić ubytek. Częściowo zależy to od zwiększonego wytwarzania czynnika wzrostu hepatocytów. Odwrotnie, gdy poda się szczurowi lek fenobarbital, który stymuluje podziały komórek wątroby nieznanym mechanizmem (i tym samym powiększa wątrobę), a potem przerwie się podawanie fenobarbitalu, to znacznie wzrośnie śmiertelność komórek wątroby, aż powróci ona do wyjściowej wielkości, zwykle w ciągu ok. tygodnia. Tak więc wątroba utrzymuje stałą wielkość przez regulację zarówno częstości obumierania komórek, jak i częstości ich narodzin.

Programowana śmierć komórki zachodzi z udziałem śródkomórkowej kaskady proteaz

Komórki, które giną w wyniku ostrego urazu, obrzękają i pękają, uwalniając swoją zawartość do otoczenia komórek sąsiednich (proces nazywany *nekrozą komórki*), co powoduje potencjalnie uszkadzającą odpowiedź zapalną. Natomiast komórka podlegająca **śmierci programowanej** (nazywanej również **apoptozą**) umiera cicho, bez uszczerbku dla sąsiadów.



Rys. 18-20. **Śmierć komórek pomaga w dostosowaniu liczby rozwijających się komórek nerwowych do liczby zaopatrywanych przez nie komórek docelowych.** Pojawia się więcej komórek nerwowych niż może się utrzymać, przy ograniczonym uwalnianiu przez komórki docelowe czynników wzrostu. Toteż niektóre komórki nerwowe otrzymują za małą ilość czynników wzrostu, by podtrzymać hamowanie programu śmierci i włączają ten program. Taka strategia nadprodukcji zapewnia połączenie komórek nerwowych z wszystkimi komórkami docelowymi oraz służy automatycznemu usuwaniu „nadprogramowych" komórek nerwowych



Rys. 18-21. Śmierć komórki. Mikrografia elektronowa komórek obumarłych w procesie nekrozy (A) albo programowanej śmierci (B i C). Komórki w (A) i (B) obumarły w hodowli, natomiast komórka w (C) obumarła w rozwijającej się tkance i została sfagocytowana przez komórkę sąsiednią. Komórka w (A) sprawia wrażenie eksplodującej, natomiast w (B) i (C) komórki są zagęszczone, ale poza tym wyglądają stosunkowo prawidłowo. Duże wakuole w cytoplazmie komórki w (B) są niestałą strukturą w komórkach podczas śmierci programowanej. (Dzięki uprzejmości: Julia Burne)

Komórka kurczy się: cytoszkielet podlega zniszczeniu, otoczka jądrowa rozpada się, a jądrowy DNA jest cięty na fragmenty. Jest bardzo ważne, że powierzchnia obumierającej komórki zmienia się zyskując właściwości powodujące, iż komórka ta jest natychmiast fagocytowana przez sąsiednie komórki albo przez makrofagi (wyspecjalizowane komórki fagocytujące, omówione w rozdz. 14), przez co nie następuje uwolnienie zawartości obumierającej komórki do otoczenia (rys. 18-21).

Wydaje się, że we wszystkich komórkach zwierzęcych funkcjonuje podobny układ odpowiedzialny za ten rodzaj kontrolowanej śmierci samobójczej. Składa on się z rodziny proteaz (enzymów rozcinających inne białka), które same są aktywowane proteolitycznym rozcięciem będącym odpowiedzią na sygnały indukujące programowaną śmierć komórki. Zaktywowane proteazy rozcinają i tym sposobem aktywują inne proteazy należące do tej samej rodziny białek, co razem stanowi kaskadę proteaz wzmacniającą efekt początkowy. Proteazy rozcinają następnie inne kluczowe białka w komórce, zabijając ją szybko i sprawnie. Na przykład jedna z proteaz rozcina jądrowe białka laminy powodując nieodwracalny rozpad blaszki jądrowej (rys. 18-22).

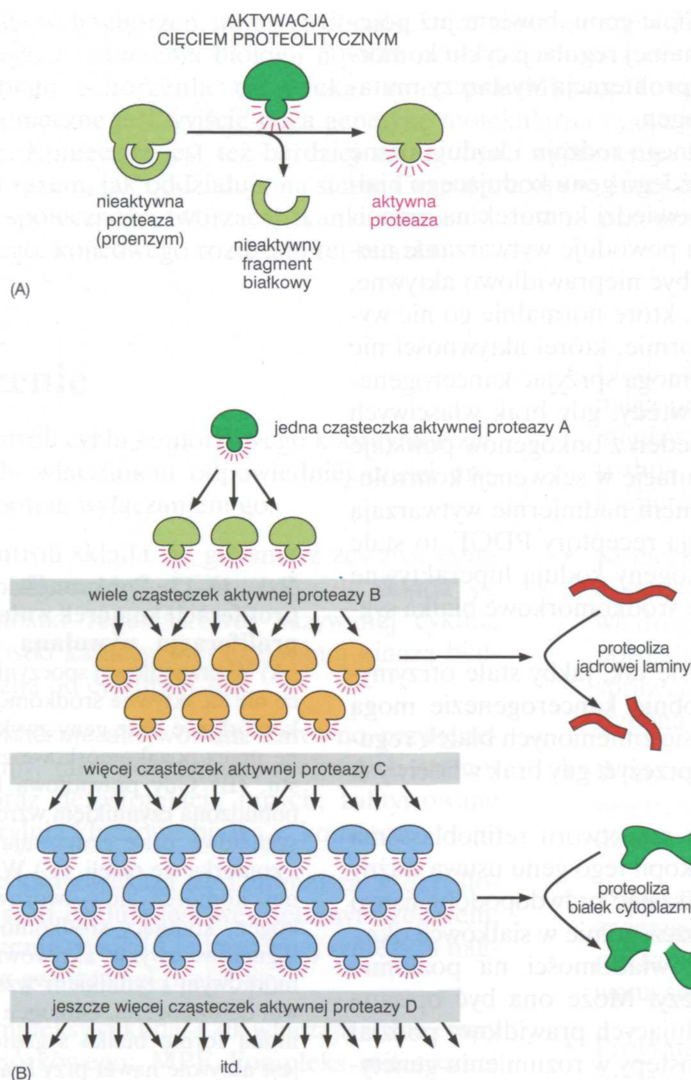
Układ śmierci samobójczej jest regulowany sygnałami z innych komórek. Niektóre działają jak sygnały zabijania, aktywując mechanizm samobójstwa komórki. W ten sposób działa hormon tarczycy w ogonie kijanki podczas metamorfozy (patrz rys. 18-19). Inne działają jako sygnały przeżycia, hamując samobójstwo, by utrzymać komórkę przy życiu (patrz rys. 18-20).

W organizmie wielokomórkowym programowana śmierć komórki jest zdarzeniem zwyczajnym, normalnym i ogólnie łagodnym. Natomiast niewłaściwa proliferacja i przeżywanie zbędnych komórek stanowią rzeczywiste niebezpieczeństwo, jak to zaraz przedstawimy.

Pytanie 18-5. Jak myślisz, dlaczego programowana śmierć komórki zachodzi innym mechanizmem niż nekroza? Jakie byłyby skutki, gdyby programowana śmierć komórki nie przebiegała w tak „gładki" i uporządkowany sposób, w którym komórka niszczy się sama od wnętrza i zapobiega uwolnieniu swej zawartości do przestrzeni pozakomórkowej?

Komórki nowotworowe omijają „społeczne" kontrole proliferacji i przeżywania komórek

Nowotwory są wynikiem mutacji, które pozwalają komórkom obejść zwykłe kontrole proliferacji i przeżywania. Komórka organizmu mutuje w se-



Rys. 18-22. W programowanej śmierci komórek bierze udział kaskada proteaz. (A) Każda proteaza „śmierci" powstaje jako nieaktywny proenzym aktywowany przez cięcie proteazą należącą do tej samej rodziny białek. (B) Każda zaktywowana cząsteczka proteazy może ciąć aktywować wiele cząsteczek proenzymu, a te aktywują jeszcze więcej cząsteczek proteazy. Toteż początkowa aktywacja małej liczby cząsteczek proteaz, przez łańcuchową reakcję wzmocnienia (kaskadę), daje wybuch aktywacji dużej liczby cząsteczek proteazy. Niektóre z aktywowanych proteaz rozkładają liczne kluczowe dla komórki białka, takie jak jądrowe laminy, co prowadzi do kontrolowanej śmierci komórki

rii przypadkowych zdarzeń i uzyskuje zdolność proliferowania bez normalnych kontroli. Jej potomstwo dziedziczy mutacje i daje początek nowotworowi rosnącemu bez ograniczeń.

Jak opiszemy w następnym rozdziale, błędna kontrola proliferacji nie jest jedyną cechą komórki nowotworowej, chociaż jest cechą podstawową i ważną. Mutacje, które upośledzają komórkę nowotworową pod tym względem, dotyczą dwóch szerokich kategorii genów: *genów proliferacji* kodujących białka wspomagające podziały komórki prawidłowej oraz *genów hamujących proliferację* kodujących białka normalnie wspomagające zahamowanie cyklu komórkowego we wcześniej już omawianych punktach kontrolnych.

Mutacja w genie odpowiedzialnym za proliferację prowadząca do jego nadekspresji bądź hiperaktywności powoduje nadmierne podziały komórki. Taki zmutowany gen określa się jako **onkogen** (tj. gen wspomagający nowotwór), natomiast prawidłowy odpowiedni gen określamy jako *protoonkogen.* Również mutacja inaktywująca gen antyproliferacyjny może uwolnić komórkę z ograniczania podziałów i tym sposobem spowodować nadmierną proliferację. Stąd geny antyproliferacyjne obecne w komórkach prawidłowych często określa się jako **geny supresorowe nowotworów**. W komórkach diploidalnych prawidłowych są dwie kopie każdego genu supresorowego; aby komórka utraciła kontrolę proliferacji, muszą

zostać utracone bądź zinaktywowane obie kopie genu, bowiem już pojedyncza kopia genu zwykle wystarcza do normalnej regulacji cyklu komórkowego. Przeciwnie, do utraty kontroli nad proliferacją wystarczy mutacja tylko jednej kopii protoonkogenu w onkogen.

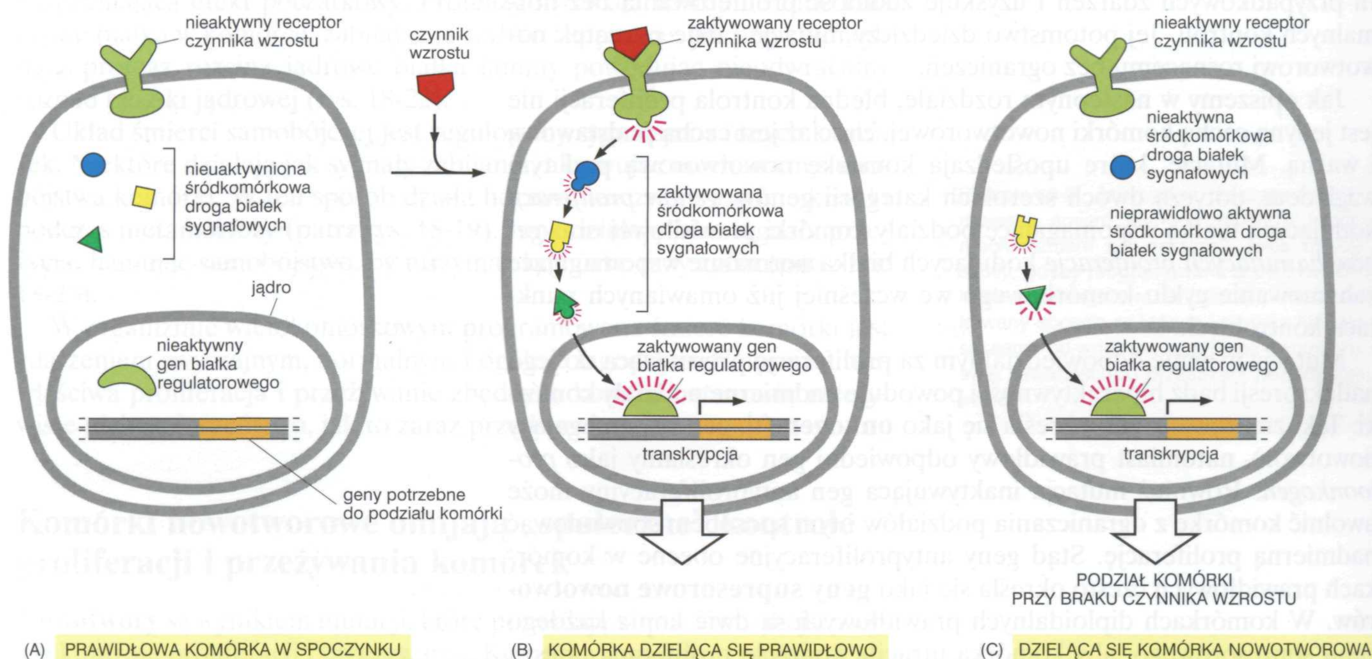
Protoonkogeny i geny supresorowe są różnego rodzaju i kodują różne typy białek. Onkogen może powstać np. z każdego genu kodującego białka dróg sygnałowych biorących udział w odpowiedzi komórek na czynniki wzrostu (omówiono w rozdz. 15). Mutacja powoduje wytwarzanie nieprawidłowo aktywnego białka. Białko może być nieprawidłowo aktywne, ponieważ jest wytwarzane: 1) przez komórki, które normalnie go nie wytwarzają, 2) w nadmiernych ilościach 3) w formie, której aktywności nie można kontrolować. Takie zmutowane geny mogą sprzyjać kancerogenezie wspierając proliferację komórek nawet wtedy, gdy brak właściwych sygnałów z zewnątrz komórki. Na przykład jeden z onkogenów powstaje z genu dla czynnika wzrostu PDGF przez mutację w sekwencji kontrolującej jego ekspresję. Komórki z tym onkogenem nadmiernie wytwarzają prawidłowy PDGF i jeżeli równocześnie mają receptory PDGF, to stale będą się pobudzać do proliferacji. Inne onkogeny kodują hiperaktywne receptory czynnika wzrostu lub hiperaktywne śródkomórkowe białka sygnałowe (omawiane w rozdz. 15).

Komórki z takim onkogenem zachowują się tak, jakby stale otrzymywały sygnał do podziału (rys. 18-23). Podobnie kancerogenezie mogą sprzyjać mutacje prowadzące do pojawienia się zmienionych białek regulujących apoptozę komórki, bo pozwalają jej przeżyć, gdy brak właściwych sygnałów.

Przykładem genu supresorowego jest gen nowotworu retinoblastoma (Rb) wspomniany na s. 587; inaktywacja obu kopii tego genu usuwa ważny hamulec cyklu komórkowego znacznie zwiększając prawdopodobieństwo nowotworu w pewnych podatnych tkankach, szczególnie w siatkówce oka.

Podane przykłady ilustrują przydatność wiadomości na poziomie molekularnym do zrozumienia kancerogenezy. Może ona być opisana w języku szczegółowych mechanizmów regulujących prawidłowy podział komórki, jej przeżywanie i śmierć. Szybkie postępy w rozumieniu genetyki molekularnej nowotworów są obiecujące, bo mogą znacznie poprawić

Rys. 18-23. Porównanie prawidłowej proliferacji komórek z nieograniczoną proliferacją wywołaną onkogenem. (A) W prawidłowej spoczynkowej komórce nie są aktywne śródkomórkowe białka komórkowe oraz geny zwykle aktywowane przez pozakomórkowe czynniki wzrostu. (B) Gdy prawidłowa komórka jest pobudzona czynnikiem wzrostu, te białka sygnałowe oraz geny stają się aktywne i komórka się dzieli. (C) W przedstawionej komórce nowotworowej protoonkogen, kodujący śródkomórkowe białko sygnałowe zwykle aktywowane poza komórkowym czynnikiem wzrostu, zmutował do onkogenu. Onkogen koduje zmienioną formę białka sygnałowego, które jest aktywne nawet przy braku przyłączonego czynnika wzrostu



wyniki leczenia tych schorzeń, mimo że dotąd jeszcze to się nie stało. Jednak do pełnego zrozumienia biologii nowotworów, jak również prawie każdego innego schorzenia człowieka, oraz prawidłowej funkcji organizmu konieczne jest wyjście poza genetykę molekularną i pojedynczą komórkę. Konieczne jest też bardziej szczegółowe wyjaśnienie, jak komórki żyją razem, jak oddziałują na siebie i współpracują w dużej zorganizowanej społeczności tworzącej tkanki i narządy. Jest to przedmiotem następnego, końcowego rozdziału tej książki.

Pytanie 18-6. Wyjaśnij, dlaczego mutacja tylko jednej z dwóch kopii protoonkogenu w diploidalnej komórce może spowodować powstanie nowotworu, skoro w przypadku genu supresorowego dochodzi do takiego stanu dopiero wtedy, kiedy mutacji podlegają obie kopie.

Streszczenie

- Układ kontroli cyklu komórkowego koordynuje zjawiska cyklu włączaniem odpowiedniej części programu, a potem wyłączaniem go.
- Układ kontroli składa się głównie z zestawu kompleksów białkowych, w których każdy składa się z podjednostki regulatorowej nazywanej cykliną i podjednostki katalitycznej nazywanej kinazą białkową zależną od cykliny (Cdk).
- Cdk są cyklicznie aktywowane zarówno przyłączeniem cykliny, jak i fosforylacją niektórych aminokwasów oraz defosforylacją innych; zaktywowane Cdk fosforylują kluczowe białka w komórce.
- Stężenie cyklin zwiększa się i zmniejsza w określonych okresach cyklu i jest wewnętrznym zegarem; wzrost stężenia wynika z jednostajnej syntezy, a nagły spadek z gwałtownej proteolizy.
- Różne kompleksy cyklina–Cdk włączają różne etapy cyklu komórkowego: MPF, kompleks mitotycznej cykliny–Cdk wprowadza komórkę w mitozę; kompleksy cyklina–Cdk fazy S wprowadzają komórkę w fazę S.
- Układ kontroli cyklu komórkowego może zatrzymać cykl w określonym punkcie kontrolnym, by upewnić się, że następny etap w cyklu nie rozpocznie się przed ukończeniem poprzedniego.
- Cykl komórkowy może być zatrzymany co najmniej dwoma mechanizmami: 1) białka hamujące Cdk mogą blokować składanie lub aktywność jednego lub kilku kompleksów cyklina–Cdk albo 2) może ustać wytwarzanie składników układu kontroli.
- Liczba komórek zwierzęcia jest regulowana kombinacją programów śródkomórkowych i oddziaływań między komórkami (kontrola socjalna), które kontrolują proliferację komórek, ich przeżywanie i śmierć.
- Komórki zwierzęce proliferują tylko po stymulacji czynnikami wzrostu, które aktywują śródkomórkowe drogi sygnałowe. Przerywają one hamulce, które normalnie blokują progresję cyklu; ten mechanizm sprawia, że komórka dzieli się tylko wtedy, gdy potrzebna jest komórka dodatkowa.
- Większość komórek zwierzęcych ma nie znany wewnętrzny mechanizm ograniczający ich liczbę podziałów.
- Wiele prawidowych komórek ginie w ciągu życia zwierzęcia przez aktywację wewnętrznego programu samobójczego. Proces ten nazywamy programowaną śmiercią komórki albo apoptozą.
- Programowana śmierć komórki zależy od rodziny proteaz, które aktywują się wzajemnie w kaskadzie proteolitycznej.
- Większość komórek zwierzęcych wymaga stałych sygnałów od innych komórek, by uniknąć śmierci programowanej; może to stanowić pomoc w utrzymaniu komórek tylko wtedy, gdy są one potrzebne i tam gdzie są potrzebne.
- Nowotwór powstaje z nagromadzenia mutacji, które aktywują geny sprzyjające proliferacji (protoonkogeny) i inaktywują geny supresorowe (geny supresorowe nowotworów) w pojedynczej komórce i jej potomstwie proliferującym dlatego bez ograniczeń.

Hasła

białkowe inhibitory Cdk	czynnik wzrostu	nowotwór	punkt kontrolny
Cdk	gen supresorowy nowotworu	onkogen	starzenie się komórki
cyklina	MPF	programowana śmierć komórki (apoptoza)	
czynnik przeżycia			

Pytania

Pytanie 18-7. Które z następujących twierdzeń jest poprawne? Wyjaśnij, dlaczego.

A. Komórki nie przechodzą z G_1 do fazy M cyklu komórkowego, gdy brak substancji odżywczych w ilościach wystarczających do zakończenia całego cyklu.
B. W programowanej śmierci komórki uczestniczą specjalne śródkomórkowe proteazy, z których jedna rozcina laminy jądrowe.
C. Rozwijające się neurony współzawodniczą o ograniczone ilości czynników przeżycia.
D. Niektóre białka kontroli cyklu komórkowego kręgowców funkcjonują, gdy uzyska się je w drodze ekspresji w komórkach drożdży.
E. Można badać mutanty drożdży mające ułomne białka kontroli cyklu komórkowego, mimo że białka te są konieczne do życia komórki.
F. O enzymatycznej aktywności białka Cdk decydują zarówno stan jego fosforylacji, jak i obecność cykliny.
G. Zmutowane geny supresorowe nowotworów mogą się stać onkogenami i tym sposobem wywołać nowotwór.

Pytanie 18-8. Jedną z funkcji mitotycznych Cdk (kinazy białkowej MPF) jest spowodowanie nagłego spadku stężenia cyklin od połowy fazy M. Opisz skutki takiego nagłego spadku i podaj możliwe wytłumaczenie tego zjawiska.

Pytanie 18-9. Porównaj reguły rządzące proliferacją komórek u zwierzęcia do tych rządzących zachowaniem się ludzkiej społeczności. Co by się stało zwierzęciu, gdyby jego komórki zachowywały się tak, jak ludzie zwykle zachowują się w naszym społeczeństwie? Czy można zastosować reguły rządzące proliferacją komórek do ludzkiej społeczności?

Pytanie 18-10. Na rys. 18-8 pokazano wzrost stężenia cyklin i zwiększenie aktywności MPF w komórkach podczas cyklu komórkowego. Zwraca uwagę, że stężenie cyklin zwiększa się w cyklu powoli i stale, natomiast aktywność MPF wzrasta nagle. Jak myślisz, z czego ta różnica wynika?

Pytanie 18-11. W swym wysoce cenionym laboratorium naukowym Dr Wawrzyniec M. ma za zadanie wyhodowanie odmiany szczurów wielkości psa, by je umieścić poza liniami nieprzyjaciela. Jaką z poniżej przedstawionych strategii według ciebie powinien obrać Dr M., aby zwiększyć wielkość szczura?

A. Opóźnić starzenie się komórek.
B. Zablokować programowaną śmierć komórek.
C. Zablokować funkcje p53.
D. Spowodować nadprodukcję czynników przeżycia.
E. Spowodować nadprodukcję czynników wzrostu.
F. Postarać się o prawo jazdy taksówkarza i zmienić zawód.

Wyjaśnij prawdopodobne skutki każdej z możliwości.

Pytanie 18-12. Jeżeli PDGF jest kodowany przez protoonkogen i może spowodować raka, gdy zajdzie jego niewłaściwa ekspresja, to dlaczego nie powstają nowotwory w ranach, gdy PDGF jest uwalniany z płytek?

Pytanie 18-13. Jednym z ważnych efektów biologicznych dużej dawki promieniowania jonizującego jest zatrzymanie podziałów komórek.

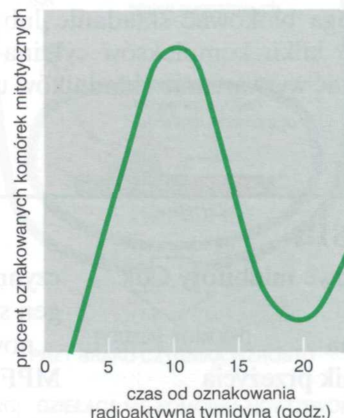
A. Jak to zachodzi?
B. Co stanie się, gdy komórka ulegnie mutacji, która nie pozwala na zatrzymanie podziałów po napromienieniu?
C. Jakie mogą być skutki takiej mutacji, jeżeli komórka nie zostanie napromieniona?
D. Dorosły człowiek, który osiągnął dojrzałość, umrze w ciągu kilku dni z powodu napromieniowania dawką zatrzymującą podziały komórkowe. Co ci to mówi (poza tym, że należy unikać dużych dawek promieniowania)?

Pytanie 18-14. Jak myślisz, co stanie się w zmutowanych komórkach, które...

A. nie mogą degradować cyklin?
B. stale mają dużą ekspresję p21?
C. nie mogą fosforylować Rb?

Pytanie 18-15. Izolowano wiele zmutowanych drożdży ułomnie kontrolujących cykl komórkowy. Proliferują one normalnie w niskich temperaturach (30°C), ale wykazują nieprawidłowy wzrost i podziały w wyższej temperaturze (37°C). Dwa zmutowane szczepy (nazywane „gee" oraz „wee") z zaburzeniem w różnych miejscach tego samego genu dają bardzo różną odpowiedź przy podwyższeniu temperatury. Komórki szczepu gee rosną, aż staną się ogromne, ale przestały się dzielić. Komórki szczepu wee mają bardzo krótki cykl komórkowy i dzielą się, gdy są znacznie mniejsze niż zwykle. Przedstaw możliwy model wyjaśnienia tych obserwacji i powiedz, jak może się zachowywać normalne białko kodowane przez ten gen.

Pytanie 18-16. Jeżeli komórki rosną w środowisku zawierającym radioaktywną tymidynę, to będzie ona konwalencyjnie włączona do komórkowego DNA w fazie S. Radioaktywny DNA można wykryć w jądrach pojedynczych komórek autoradiografią (tj. przez umieszczenie na komórkach filmu fotograficznego; wtedy radioaktywne komórki będą aktywować film, który po wywołaniu będzie zaczerniony, co można obejrzeć pod mikroskopem). Rozważ proste doświadczenie, w którym komórki zostały radioaktywnie oznakowane tą metodą tylko przez krótki czas (ok. 30 min). Następnie radioaktywne środo-



Rys. P18-16

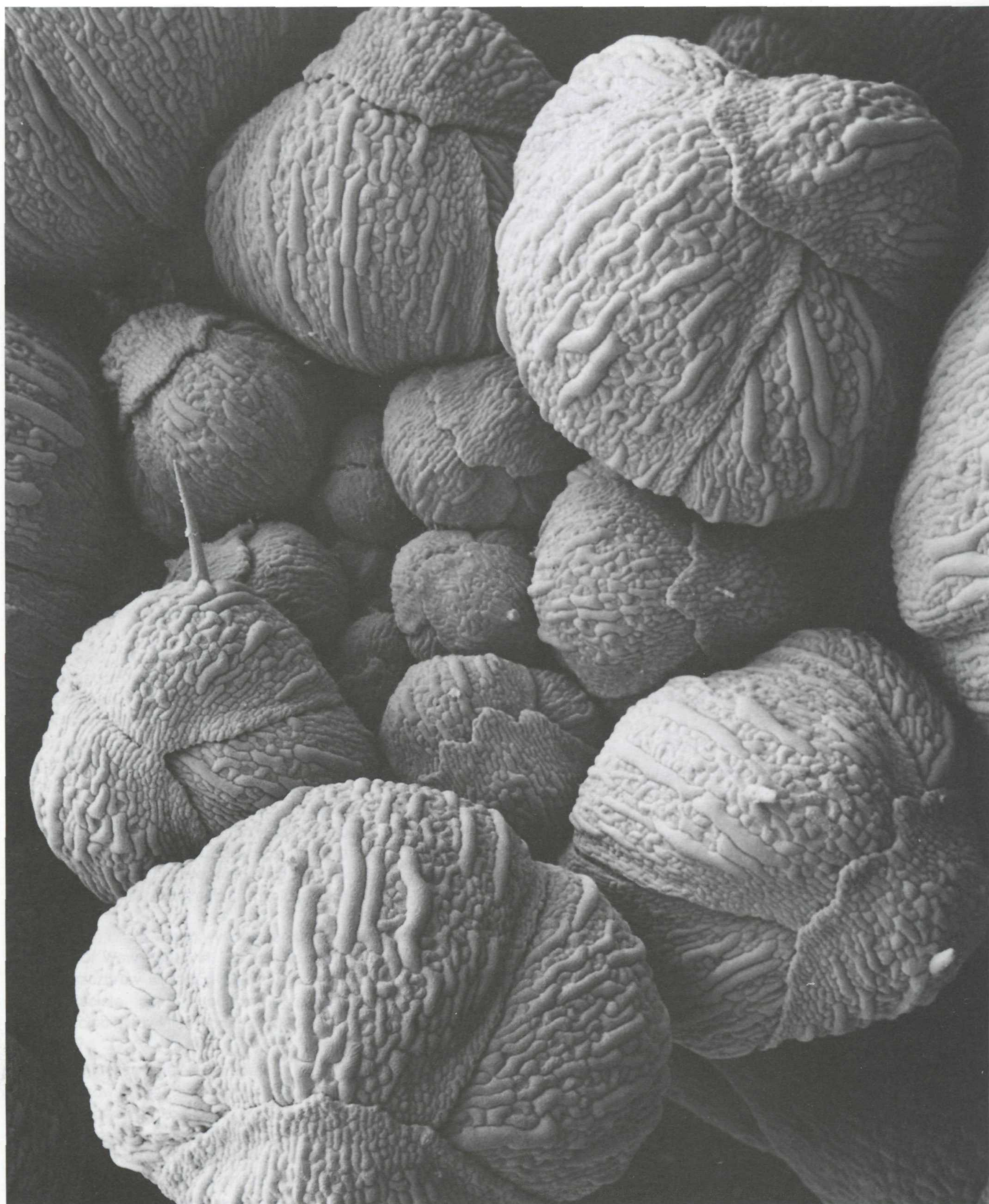
wisko z tymidyną zostało zastąpione środowiskiem zawierającym tymidynę nie znakowaną i komórki rosły przez dodatkowy okres. W różnych odstępach czasu od momentu wymiany środowiska komórki badano pod mikroskopem. Określono frakcję komórek znajdujących się w mitozie (którą łatwo rozpoznać po chromosomach) zawierającą radioaktywny DNA i przedstawiono ją na wykresie jako funkcję czasu po znakowaniu radioaktywną tymidyną (rys. P18-16).

A. Czy wszystkie komórki (włączając komórki we wszystkich fazach cyklu komórkowego) będą zawierać radioaktywny DNA po procedurze znakowania?
B. Początkowo nie było mitotycznych komórek zawierających radioaktywny DNA. Dlaczego?
C. Objaśnij wzrost i spadek krzywej.
D. Oceń na podstawie tych danych długość fazy G_2.

Pytanie 18-17. Komórki wątroby proliferują zarówno u alkoholików, jak i u chorych na raka wątroby. Jaka jest różnica mechanizmów indukowania proliferacji komórek u obu tych grup?

Pytanie 18-18. Obejrzyj dokładnie mikrografię elektronową na rys. 18-21. Opisz różnice między komórką, która obumarła w nekrozie, a tą, która obumarła w wyniku programowanej śmierci komórki. Jak obrazy te potwierdzają różnice między tymi procesami? Wyjaśnij odpowiedź.

Pytanie 18-19. Czy można byłoby uniknąć raka, gdyby spowodować niezwykle duże stężenie produktów ekspresji genów supresorowych we wszystkich komórkach u człowieka? Objaśnij odpowiedź.



Zwarta grupa rozwijających się pąków kwiatowych *Arabidopsis*, widziana w skaningowym mikroskopie elektronowym. W tym stadium rozwoju każdy kwiat, ze swymi płatkami korony, pręcikami i słupkami, jest ciasno opakowany w dokładnie dopasowane, cztery działki kielicha, w których wyraźnie są widoczne poszczególne komórki epidermalne. Te różniące się kształtem i wielkością komórki są ściśle zespolone z sąsiednimi komórkami poprzez swoje ściany (zewnątrzkomórkową matriks) i tworzą spójną tkankę. (Dzięki uprzejmości: Kim Findlay)

19

Tkanki

SUBSTANCJA MIĘDZYKOMÓRKOWA I TKANKI ŁĄCZNE

- **Komórki roślinne są wyposażone w twarde ściany zewnętrzne**
- **Włókna celulozowe zapewniają ścianie komórki roślinnej wytrzymałość na rozciąganie**
- **Tkanka łączna zwierząt składa się głównie z substancji międzykomórkowej**
- **Kolagen zapewnia wytrzymałość na rozciąganie w zwierzęcych tkankach łącznych**
- **Komórki wydzielają i organizują kolagen**
- **Integryny łączą substancję międzykomórkową z cytoszkieletem wewnątrz komórek**
- **Żel polisacharydowy i białkowy wypełnia wolne przestrzenie i zapobiega kompresji**

NABŁONKI POKRYWAJĄCE I POŁĄCZENIA MIĘDZYKOMÓRKOWE

- **Nabłonki mają spolaryzowane powierzchnie i spoczywają na błonie podstawnej**
- **Połączenia zamykające powodują szczelność nabłonka i oddzielają powierzchnie szczytowe oraz podstawne**
- **Połączenia międzykomórkowe związane z cytoszkieletem łączą silnie komórki ze sobą i z błoną podstawną**
- **Połączenia komunikacyjne umożliwiają przechodzenie jonom i małym cząsteczkom z komórki do komórki**

UTRZYMANIE FUNKCJONOWANIA I ODNOWA TKANEK ORAZ ZABURZENIE TYCH PROCESÓW W NOWOTWORACH

- **Różne tkanki są odnawiane z różną częstotliwością**
- **Komórki macierzyste są źródłem dostarczającym ciągle nowych ostatecznie zróżnicowanych komórek**
- **Mutacje w pojedynczej dzielącej się komórce mogą być przyczyną wymknięcia się tej komórki i jej potomstwa spod prawidłowej kontroli**
- **Nowotwór jest konsekwencją mutacji i naturalnej selekcji w obrębie populacji komórek tworzących organizm**
- **Nowotwór wymaga nagromadzenia się mutacji**

ROZWÓJ

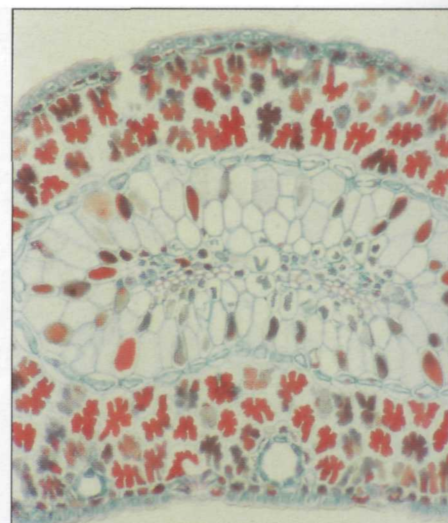
- **Zaprogramowane przemieszczanie komórek umożliwia planową budowę ciała zwierząt**
- **Komórki włączają różne zespoły genów zgodnie ze swoim umiejscowieniem i historią rozwojową**
- **Rozproszone sygnały mogą dostarczać komórce informacji o jej położeniu**
- **Badania *Drosophila* dostarczyły klucza do rozwoju kręgowców**
- **Podobne geny w całym świecie zwierzęcym dostarczają komórkom informacji o ich położeniu**

Komórki są cegiełkami budującymi organizmy wielokomórkowe. Wydaje się, że jest to proste twierdzenie, lecz budzi głębokie wątpliwości. Komórki nie wyglądają jak cegiełki, są małe i ściśnięte. Jak mogą być one użyte do budowy żyrafy lub olbrzymich sekwoi? Każda komórka jest otoczona cienką błoną, cieńszą niż jedna stutysięczna milimetra i od jej integralności zależy życie komórki. Jak więc komórki mogą być razem mocno połączone, a ich błony nie uszkodzone, aby utworzyć mięśnie unoszące ciężar słonia? Najbardziej tajemnicze ze wszystkiego jest to, że jeśli komórki są cegiełkami, to gdzie jest budowniczy i gdzie znajdują się plany architektoniczne? Jak powstają wszystkie różne typy komórek u roślin i u zwierząt, i co powoduje, że każda znajduje się we właściwym miejscu według wypracowanego wzoru (rys. 19-1)?

Większość komórek w organizmach wielokomórkowych jest zorganizowana we współpracujące zespoły zwane **tkankami**. U kręgowców są to tkanka nerwowa, mięśniowa, nabłonkowa i łączna (rys. 19-2). W tym rozdziale rozpoczniemy od omówienia architektury tkanek z mechanicznego punktu widzenia. Zobaczymy, że tkanki składają się nie tylko z komórek z wewnętrzną siecią filamentów (włókienek) cytoszkieletu (rozdz. 16), lecz także z **substancji międzykomórkowej**, którą komórki wydzielają dookoła siebie; jest to substancja, która tkankom podporowym nadaje ich wytrzymałość. Komórki mogą się łączyć razem za pomocą substancji międzykomórkowej albo za pomocą bezpośrednich połączeń. Omówimy **połączenia międzykomórkow**e, które łączą komórki w elastyczne, ruchome tkanki zwierzęce, przenoszące siły z cytoszkieletu jednej komórki na następną komórkę lub na substancję międzykomórkową.

Do budowy tkanek potrzeba więcej niż tylko mechaniki. Tak jak dom potrzebuje instalacji wodnych, linii telefonicznych i innego wyposażenia, tak tkanka zwierzęca potrzebuje naczyń krwionośnych, nerwów i innych składników utworzonych przez różne rodzaje wyspecjalizowanych komórek. Wszystkie składniki komórkowe muszą bezbłędnie współpracować, a wiele z nich wymaga kontroli funkcjonowania i odnowy. Komórki giną i muszą być zastępowane przez nowe komórki prawidłowego typu, w określonym miejscu i w tej samej liczbie. Nieprawidłowości w odnowie tkanek są podstawowym problemem medycznym, gdyż nieprawidłowości takie dotyczące komórek zmutowanych są odpowiedzialne za powstawanie nowotworów.

Problem, jak tworzą się wszystkie rodzaje wyspecjalizowanych komórek i jak zostają zorganizowane w tkanki organizmu, prowadzi nas do najstarszego i najbardziej podstawowego pytania w biologii: jak powstaje cały wielokomórkowy organizm z jednej zapłodnionej komórki jajowej? Ten problem **rozwojowy** ma charakter kompleksowy, lecz można go rozwiązać i na następnych stronach tej książki przedstawimy to w krótkim zarysie.



Rys. 19-1. Barwiony skrawek liścia sosny (igła sosny) w przekroju pokazującym precyzyjny sposób organizacji różnych typów komórek

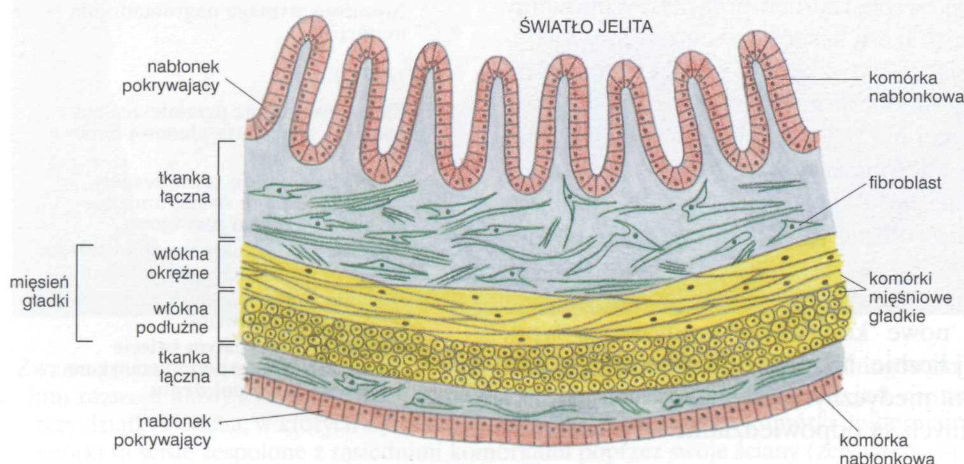
Substancja międzykomórkowa i tkanki łączne

Rośliny i zwierzęta rozwinęły swoją wielokomórkową organizację niezależnie i ich tkanki są zbudowane na odrębnych zasadach. Zwierzęta są drapieżcami w stosunku do innych żyjących stworzeń, dlatego też muszą być silne i zwinne oraz muszą mieć tkanki zdolne do szybkiego ruchu, a komórki tworzące te tkanki muszą mieć zdolność do tworzenia i przenoszenia sił mechanicznych oraz szybkiej zmiany kształtów. Rośliny natomiast są osiadłe, ich tkanki są mniej lub bardziej sztywne, mimo że komórki rozpatrywane oddzielnie są słabe i kruche.

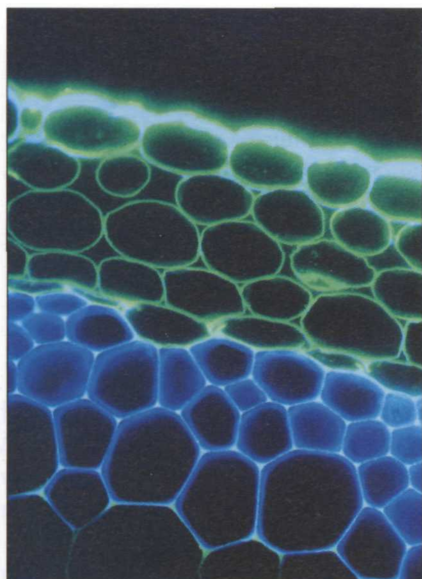
Wytrzymałość tkanki roślinnej jest warunkowana obecnością **ścian komórkowych** tworzących rodzaj pudełek, które otaczają, chronią i nadają kształt każdej komórce tej tkanki (rys. 19-3). Ściana komórkowa jest swego rodzaju zewnątrzkomórkową matriks, którą komórka roślinna wydziela i odkłada wokół siebie. Komórka kontroluje skład ściany, która może być gruba i twarda, jak w drewnie, lub cienka i giętka, jak w liściu. Ogólny schemat budowy tkanki jest jednak zawsze taki sam: wiele „scementowanych" ze sobą mikroskopijnych pudełek z delikatnym, żywym protoplastem wewnątrz każdego z nich.

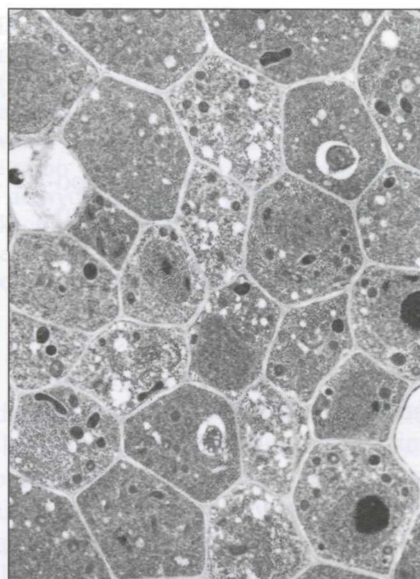
Jak odnotowano to w rozdz. 1, właśnie ta ściśle upakowana masa mikroskopijnych komór, widzianych trzy wieki temu na skrawku korka przez Roberta Hooke'a, stała się podstawą do wprowadzenia określenia „komórka".

Tkanki zwierzęce są bardziej różnorodne. Podobnie jak tkanki roślinne składają się z substancji międzykomórkowej oraz z komórek, lecz składniki te są zorganizowane na wiele różnych sposobów. W niektórych tkankach, np. w kościach i ścięgnach, substancja międzykomórkowa jest obfita i mechanicznie najważniejsza, w innych, np. w mięśniach lub naskórku, substancja międzykomórkowa jest bardzo skąpa i cytoszkielet komórek sam przenosi napięcia mechaniczne. Zanim przejdziemy do zwierząt, krótko omówimy rośliny.



Rys. 19-2. Organizacja komórek w tkankach. Uproszczony schemat przekroju przez część ściany jelita ssaka. Ten długi narząd, w kształcie cewy, jest zbudowany z tkanki nabłonkowej (kolor *czerwony*), tkanki łącznej (kolor *zielony*) i mięśniowej (kolor *żółty*). Każda tkanka składa się z zespołu komórek utrzymywanych razem za pomocą przylegania komórek do siebie, do substancji międzykomórkowej lub do obu jednocześnie



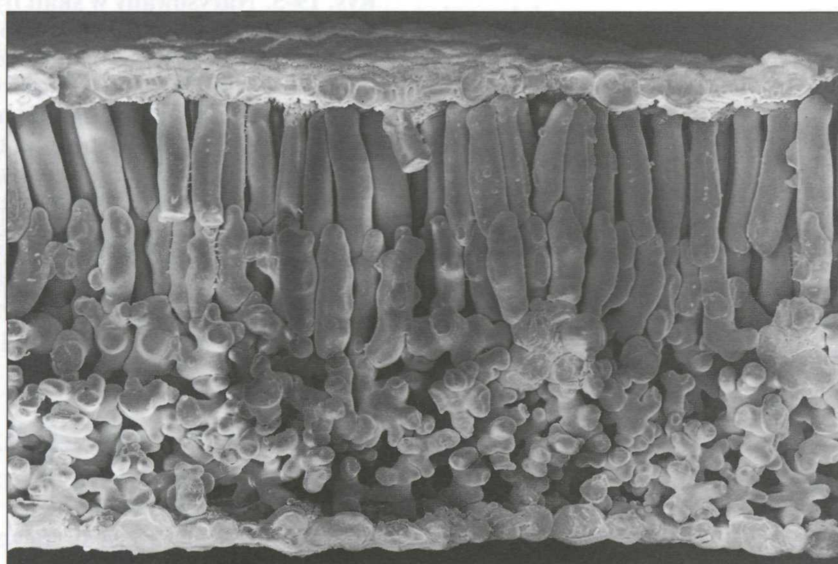


Rys. 19-3. Ściana komórki roślinnej. (A) Pokazano przekrój poprzeczny przez fragment łodygi rośliny kwiatowej z rodzaju *Arabidopsis*, po wybarwieniu fluorochromami (czyli barwnikami używanymi w mikroskopii fluorescencyjnej — *przyp. tłum.*), które pozwalają odróżnić dwa różne składniki ściany komórkowej — celulozę — kolor *niebieski* oraz inny polisacharyd (pektynę) — kolor *zielony*. Protoplasty komórek nie wybarwiły się i są niewidoczne na tym preparacie. (B) Na mikrografii elektronowej młodych komórek korzenia tej samej rośliny widać wyraźnie zarówno protoplasty, jak i ściany komórkowe. (Dzięki uprzejmości: Paul Linstead)

Komórki roślinne są wyposażone w twarde ściany zewnętrzne

Naga komórka roślinna, sztucznie pozbawiona swojej ściany, jest delikatna i bardzo podatna na uszkodzenia. Z zachowaniem niezbędnych środków ostrożności można ją utrzymać przy życiu w kulturze *in vitro*; pęka jednak łatwo, a nawet niewielkie niedostosowanie warunków osmotycznych podłoża może powodować jej pęcznienie. Cytoszkielet komórek roślinnych, w odróżnieniu od komórek zwierzęcych, nie zawiera filamentów pośrednich, które warunkują m. in. wytrzymałość mechaniczną. Tak więc komórka roślinna pozbawiona ściany faktycznie nie ma ochrony przed rozerwaniem. Dlatego zewnętrzna ściana jest dla niej tak istotna.

Ściana komórki roślinnej musi być wystarczająco twarda, lecz niekoniecznie musi być sztywna. Spowodowane warunkami osmotycznymi zwiększenie objętości komórki, ograniczone przez opór ściany komórko-



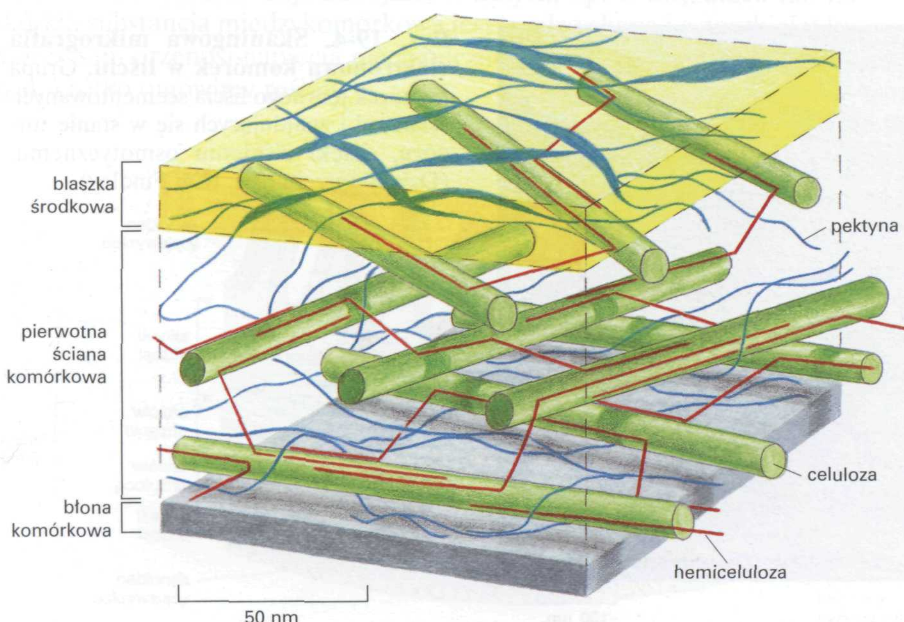
Rys. 19-4. Skaningowa mikrografia elektronowa komórek w liściu. Grupa komórek jędrnego liścia scementowanych ścianami i znajdujących się w stanie turgoru, dzięki ciśnieniu osmotycznemu. (Dzięki uprzejmości: Kim Findlay)

wej, umożliwia pozostawanie protoplastu w stanie jędrności (zwanej turgorem — *przyp. tłum.*). Zespół takich połączonych ściśle ze sobą jędrnych komórek tworzy stosunkowo sztywną tkankę (rys. 19-4). Tak jest np. w jędrnym liściu sałaty. Utrata wody powoduje, że protoplasty komórek kurczą się, a liść więdnie.

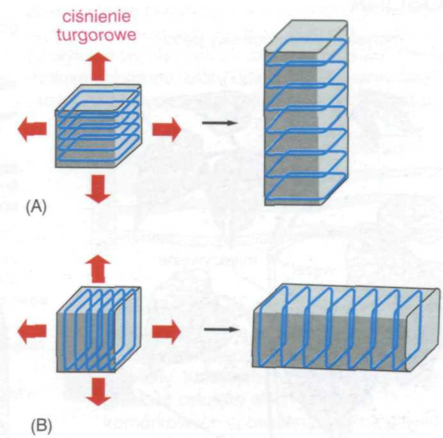
W roślinie wielokomórkowej większość nowo powstałych komórek początkowo wytwarza stosunkowo cienkie *pierwotne ściany komórkowe*, które są zdolne do stopniowego rozszerzania się. Dzięki temu mogą one dostosowywać swe wymiary do dalszego wzrostu komórki. Siłą umożliwiającą wzrost jest ta sama siła, która warunkuje jędrność liścia sałaty — ciśnienie osmotyczne, zwane *ciśnieniem turgorowym*, powstające na skutek różnicy potencjału osmotycznego między wnętrzem komórki a jej otoczeniem (patrz rozdz. 12). Kiedy wzrost komórki ustaje, a ściana nie musi się już rozszerzać, wtedy w wyniku zwiększenia grubości pierwotnej ściany komórkowej lub poprzez odkładanie poniżej istniejącej ściany nowych jej warstw, ale o innym składzie chemicznym, powstaje *wtórna ściana komórkowa*. Jest ona często znacznie bardziej sztywna od pierwotnej. Wyspecjalizowane (zróżnicowane — *przyp. tłum.*) komórki roślinne wytwarzają zwykle typy ścian przystosowane w szczególny sposób do pełnionych funkcji: pokryte woskiem, nieprzepuszczające wody zewnętrzne ściany komórek epidermy liścia; twarde, grube i zdrewniałe ściany komórek ksylemu pędu itd. Zostało to pokazane w panelu 19-1 (s. 602–603).

Włókna celulozowe zapewniają ścianie komórki roślinnej wytrzymałość na rozciąganie

Podobnie do innych zewnątrzkomórkowych matriks, ściany komórek roślinnych uzyskują swoją wytrzymałość na rozciąganie dzięki wyposażeniu w długie włókna ułożone wzdłuż linii stresu. U roślin wyższych te długie włókna są z reguły zbudowane z polisacharydu *celulozy*, najbardziej rozpowszechnionej na ziemi makrocząsteczki organicznej. Włókna celulozowe przeplatają się z innymi polisacharydami i pewnymi białkami strukturalnymi. Wszystkie te składowe elementy ściany są wzajemnie połączone tworząc złożoną strukturę cechującą się odpornością zarówno na ściskanie, jak i na rozciąganie (rys. 19-5). W komórkach o ścianach zdrewnia-



Rys. 19-5. Narysowany w skali fragment pierwotnej ściany komórki roślinnej. *Pałeczki zielone* obrazują włókna celulozowe zapewniające wytrzymałość ściany na rozciąganie; inne polisacharydy, wiążące poprzecznie włókna celulozowe (*linie czerwone*) oraz wypełniające przestrzenie między nimi (*pasma niebieskie*), warunkują wytrzymałość na ściskanie. Blaszka środkowa tworzy warstwę spajającą ściany komórkowe



Rys. 19-6. Jak orientacja mikrofibryl celulozowych w ścianie komórkowej wpływa na kierunek wydłużania się komórki. Komórki pokazane na rysunkach (A) i (B) mają początkowo identyczny kształt (przedstawiono je tutaj w postaci *sześcianów*), ale różnią się orientacją mikrofibryl celulozowych w swoich ścianach komórkowych. Mimo że ciśnienie osmotyczne jest takie samo we wszystkich kierunkach, każda z komórek wykazuje tendencję do wydłużania się w kierunku prostopadłym do kierunku ułożenia mikrofibryl, które cechują się dużą wytrzymałością na rozciąganie. Ostateczny kształt takiego organu jak pęd jest wyznaczany przez kierunek wydłużania się budujących go komórek

łych (np. w drewnie), wewnątrz podłoża (matriks) ściany znajduje się *lignina* zbudowana z innych cząsteczek niż celuloza. Na skutek obecności w niej licznych wiązań poprzecznych przypomina ona sieć i zapewnia ścianie większą sztywność oraz nieprzepuszczalność dla wody.

Aby komórka roślinna mogła rosnąć lub zmieniać swój kształt, jej ściana komórkowa musi się rozciągnąć lub ulec zniekształceniu. Ponieważ włókna celulozowe są odporne na rozciąganie, ich orientacja w ścianie jest odpowiedzialna za kierunek, w jakim rosnąca komórka będzie się powiększała: jeżeli na przykład włókna celulozowe są ułożone na obwodzie komórki jak gorset, wtedy komórka łatwiej będzie mogła rosnąć na długość niż zwiększać swój obwód (rys. 19-6). Komórka roślinna dzięki temu, że odkłada wokół siebie ścianę, kontroluje nie tylko swój kształt, ale również kierunek wzrostu tkanki, do której należy.

Celuloza jest syntetyzowana w zupełnie odmienny sposób niż większość innych makrocząsteczek zewnątrzkomórkowych. Nie jest syntetyzowana wewnątrz komórki i później eksportowana na drodze egzocytozy (rozdz. 14), ale powstaje na zewnętrznej powierzchni komórki z udziałem kompleksów enzymatycznych znajdujących się w błonie komórkowej. Transportują one monomery cukrowcowe przez tę błonę i wbudowują je do pęczka rosnących łańcuchów polimerów w miejscach ich połączenia z błoną komórkową. Każdy taki pęczek łańcuchów tworzy mikrofibrylę celulozową. Kompleksy enzymatyczne przemieszczają się w obrębie błony „wysnuwając" za sobą powstające nowe polimery, które następnie, już jako odpowiednio zorientowane włókna celulozowe, są odkładane na powierzchni błony.

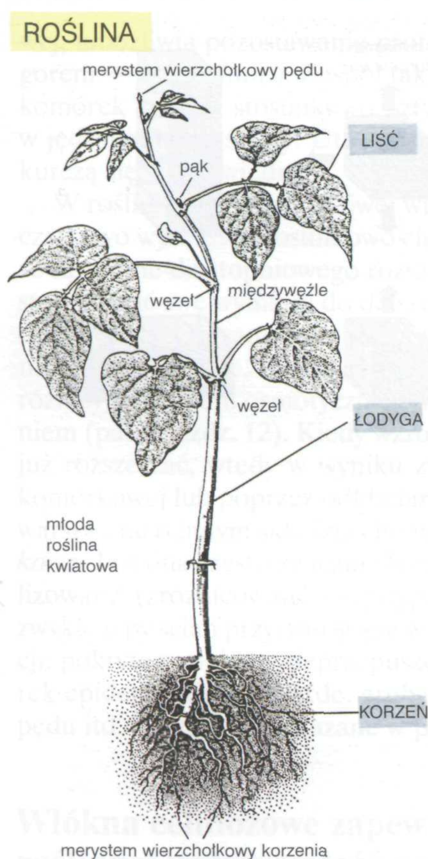
Szlaki, po których przemieszczają się kompleksy enzymatyczne, narzucają kierunek odkładania celulozy w ścianie komórkowej; co jednak wyznacza kierunek ruchu samych kompleksów? Tuż pod błoną komórkową znajdują się mikrotubule (korowe — *przyp. tłum.*), których ułożenie jest takie samo jak włókien celulozowych na zewnątrz komórki. Przyjmuje się, że właśnie te mikrotubule pełnią funkcje torów prowadzących przemieszczające się kompleksy enzymatyczne (rys. 19-7). W ten osobliwie pośredni sposób cytoszkielet kontroluje zarówno nadawanie kształtu komórce roślinnej, jak i formowanie tkanek roślinnych. Przekonamy się, że komórki zwierzęce wykorzystują swój cytoszkielet do kontrolowania architektury tkankowej w znacznie bardziej bezpośredni sposób.

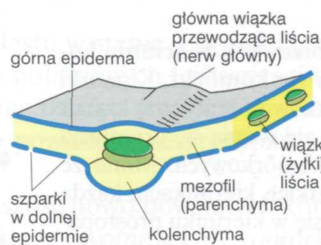
Pytanie 19-1. Komórki w łodydze siewki, która rosła w ciemności, mają horyzontalnie ułożone mikrotubule (korowe — *przyp. tłum.*). Jaki, twoim zdaniem, może to mieć wpływ na wzrost rośliny?

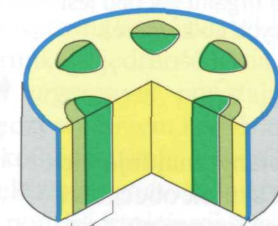
Tkanka łączna zwierząt składa się głównie z substancji międzykomórkowej

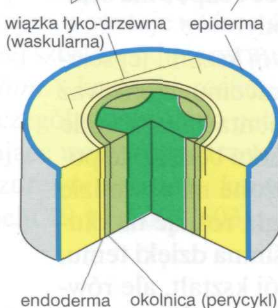
U zwierząt tradycyjnie wyróżniamy cztery główne typy tkanek — tkankę łączną, tkankę nabłonkową, tkankę nerwową i tkankę mięśniową. Jednak zasadnicza różnica w budowie w stosunku do pozostałych tkanek dotyczy

ROŚLINA









Młoda roślina kwiatowa pokazana z *lewej strony* jest zbudowana z trzech głównych organów: liści, łodygi i korzeni. Z kolei każdy organ rośliny jest utworzony z trzech typów tkanek: podstawowej (▭), okrywającej (▭) *i* systemu naczyniowego (waskularnego) (▭). Wszystkie typy tkanek wywodzą się z intensywnie dzielących się komórek wchodzących w skład merystemów wierzchołkowych (apikalnych): korzenia lub pędu. Każda tkanka zawiera stosunkowo niewielką liczbę wyspecjalizowanych typów komórek. Te trzy powszechnie spotykane typy tkanek i tworzące je komórki opisano w panelu.

TRZY TYPY TKANEK

Tkankom charakteryzującym się pełnieniem wyspecjalizowanych funkcji dają początek następujące procesy: podział komórki, jej wzrost i różnicowanie.

TKANKA OKRYWAJĄCA: jest to zewnętrzne okrycie rośliny pełniące funkcję ochronną w jej kontaktach ze środowiskiem. Tkanka okrywająca ułatwia roślinie pobieranie przez korzeń wody wraz z zawartymi w niej jonami oraz reguluje wymianę gazową w liściach i łodygach.

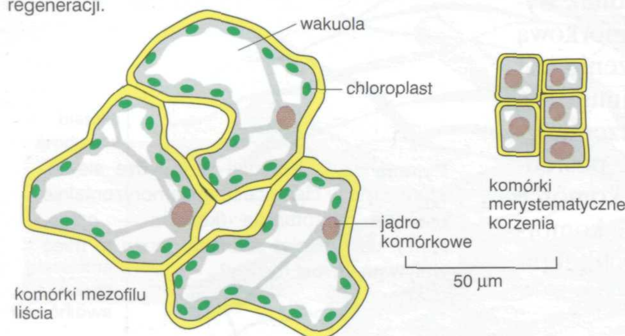
SYSTEM NACZYNIOWY (WASKULARNY): łyko (floem) i drewno (ksylem) *tworzą wspólnie system naczyniowy (waskularny)*, który ciągnie się przez całą roślinę. Tkanka ta rozprowadza pomiędzy organami rośliny wodę i roztwory wodne, a także pełni funkcję wzmacniającą.

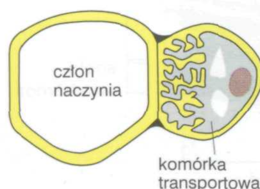
TKANKA PODSTAWOWA: ta tkanka, pełniąca funkcje wypełniające i wzmacniające, jest uważana za główny składnik młodej rośliny. Funkcjonuje ona ponadto jako „wytwórnia" substancji pokarmowych i „spiżarnia" rośliny.

TKANKA PODSTAWOWA

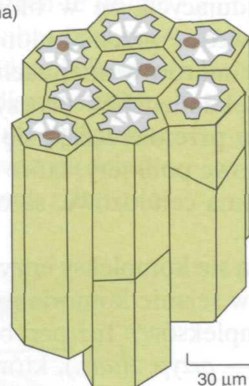
Na tkankę podstawową składają się trzy główne typy komórek określane jako: miękisz (parenchyma), zwarcica (kolenchyma) i twardzica (sklerenchyma).

Komórki parenchymatyczne spotyka się we wszystkich rodzajach tkanek roślinnych. Są to komórki *żywe i z reguły zdolne do dalszych podziałów*. Otacza je cienka pierwotna ściana komórkowa. Komórki parenchymatyczne pełnią wiele różnych funkcji. Te, które tworzą merystemy: wierzchołkowy i boczny w pędzie i korzeniu, dostarczają nowych komórek niezbędnych do wzrostu rośliny. Synteza substancji pokarmowych i ich magazynowanie odbywa się w fotosyntetyzujących komórkach liścia i łodygi (nazywanych komórkami mezofilu); komórki miękiszu (parenchymy) spichrzowego stanowią główny składnik większości owoców i warzyw. Dzięki swej zdolności do proliferacji (zwiększania liczby przez podziały – *przyp. tłum.*) komórki parenchymatyczne stanowią także źródło nowych komórek niezbędnych przy zranieniach (tworzą wtedy tkankę przyranną, kalus – *przyp. tłum.*) i w procesie regeneracji.

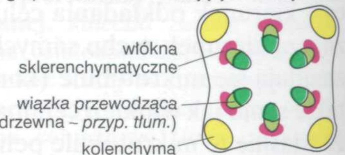




Komórki transportowe są wyspecjalizowaną formą *komórek parenchymatycznych. Można je łatwo* rozpoznać dzięki występowaniu rozbudowanych wrostów pierwotnej ściany komórkowej. Ponieważ wrostom tym towarzyszy wzrost ściśle przylegającej błony komórkowej, zwiększa się w ten sposób powierzchnia jej kontaktu z protoplastem, co ułatwia szybki transport roztworów z wnętrza komórek systemu naczyniowego i do ich wnętrza.



Kolenchyma jest zbudowana z żywych komórek, podobnych do komórek parenchymatycznych, ale różniących się od nich znacznie grubszymi ścianami komórkowymi i z reguły wydłużonym kształtem. Jej komórki są zebrane w długie, podobne do liny, włókna. *Ponieważ mogą się rozciągać, wzmacniają* one mechanicznie tkankę podstawową w tych regionach rośliny, w których występuje wzrost wydłużeniowy. Komórki kolenchymy są szczególnie powszechnie reprezentowane w subepidermalnych regionach łodygi.



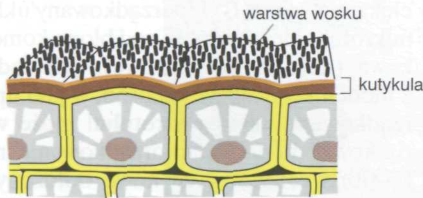
Sklerenchyma, podobnie jak kolenchyma, pełni funkcje wzmacniające. Jej komórki są jednak zwykle martwe i mają grube, zlignifikowane wtórne ściany komórkowe. Cecha ta uniemożliwia komórkom sklerenchymy rozciąganie się podczas wzrostu rośliny. Sklerenchyma występuje w dwóch formach jako: włókna, które często tworzą długie wiązki, i sklereidy (komórki kamienne – *przyp. tłum.*) – krótsze i nieregularnie rozgałęzione komórki spotykane w zewnętrznych częściach okrywy (łupiny nasiennej – *przyp. tłum.*) niektórych nasion i owoców.



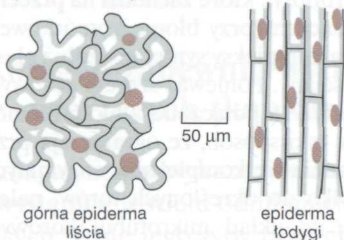
 Panel 19–1. Typy komórek i tkanek, z których są zbudowane rośliny wyższe. Tłumacz wprowadził nazwy przyjęte w polskiej terminologii botanicznej pozostawiając czasem (w nawiasach) terminy użyte przez autorów

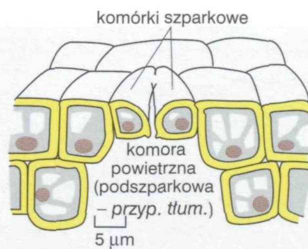
TKANKA OKRYWAJĄCA

Epiderma (skórka – *przyp. tłum.*) jest pierwotnym, zewnętrznym okryciem ochronnym ciała rośliny. Komórki epidermy ulegają także modyfikacjom tworząc szparki czy różne rodzaje włosków.



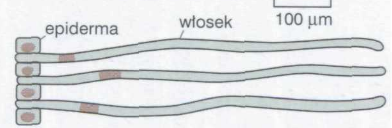
Epiderma (spotykana z reguły w postaci pojedynczej warstwy komórek) okrywa łodygę, liście i korzenie młodej rośliny. Jej komórki są żywe i mają grube pierwotne ściany komórkowe. Zewnętrzna ściana (komórek epidermy łodygi i liści – *przyp. tłum.*) jest pokryta dodatkowo warstwą kutykuli, na zewnątrz której znajduje się jeszcze warstwa wosku. Komórki epidermy przylegają ściśle do siebie (brak między nimi przestworów komórkowych – *przyp. tłum.*), tworząc różne wzory.



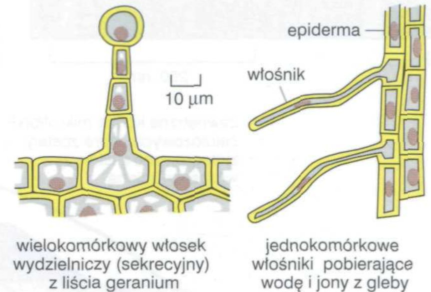


Szparki są otworami w epidermie, umiejscowionymi przeważnie na dolnej powierzchni liścia. Ich funkcją jest regulacja wymiany gazowej w roślinie. Szparka jest zbudowana z dwóch wyspecjalizowanych komórek epidermalnych zwanych *komórkami szparkowymi*, które regulują wielkość otworu (zwanego także porem – *przyp. tłum.*) szparkowego. Wzór rozmieszczenia szparek na terenie epidermy jest cechą charakterystyczną dla każdego gatunku rośliny.

Włoski (zwane także trichomami) są wystającymi ponad powierzchnię przedłużeniami komórek epidermy. Włoski występują w rozmaitych postaciach i są powszechnie spotykane we wszystkich częściach rośliny. Pełnią funkcje ochronne, biorą udział w pobieraniu (wody i rozpuszczonych w niej soli mineralnych – *przyp. tłum.*)

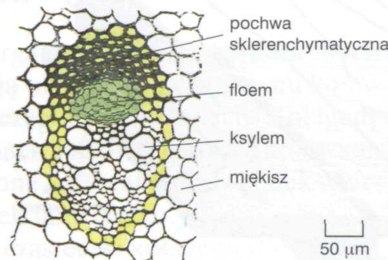


i sekrecji; przykładem włosków pełniących funkcję ochronną są młode, jednokomórkowe włoski rozwijające się w epidermie nasienia bawełny. Kiedy urosną, zwiększy się też grubość celulozy w ich ścianach komórkowych i powstaną włókna bawełny.



Wiązka łyko-drzewna (waskularna)

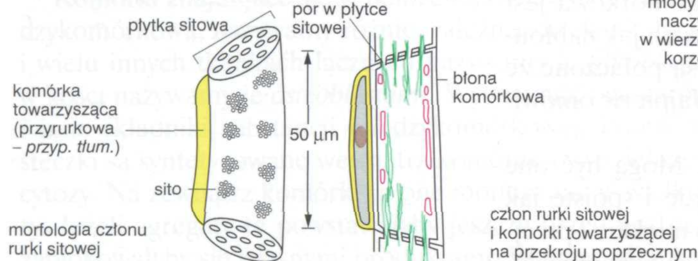
Korzenie mają z reguły pojedynczą wiązkę waskularną, natomiast łodygi mają ich kilkanaście. Każda wiązka jest kompleksem zróżnicowanych typów komórek przystosowanych do transportu roztworów wodnych.



typowa wiązka łyko-drzewna z młodej łodygi jaskra

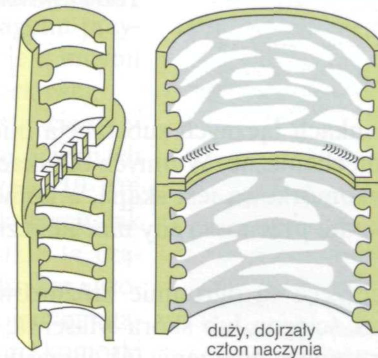
SYSTEM NACZYNIOWY (WASKULARNY)

Floem i ksylem razem tworzą w obrębie rośliny ciągły system naczyniowy. W młodych roślinach są one zwykle związane z różnymi innymi typami komórek tworząc *wiązkę łyko-drzewną*. Zarówno floem, jak i ksylem są tkankami złożonymi. Ich komórki przewodzące, zwane *członami*, są związane z komórkami parenchymatycznymi, które pełnią funkcje komórek spichrzowych i zapewniają łączność z innymi komórkami systemu, umożliwiając między nimi wymianę materiałów. Także grupy komórek kolenchymy i sklerenchymy obecne na terenie wiązki, dostarczają dodatkowego wzmocnienia mechanicznego.

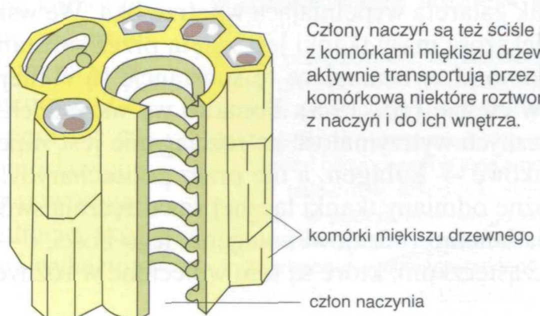


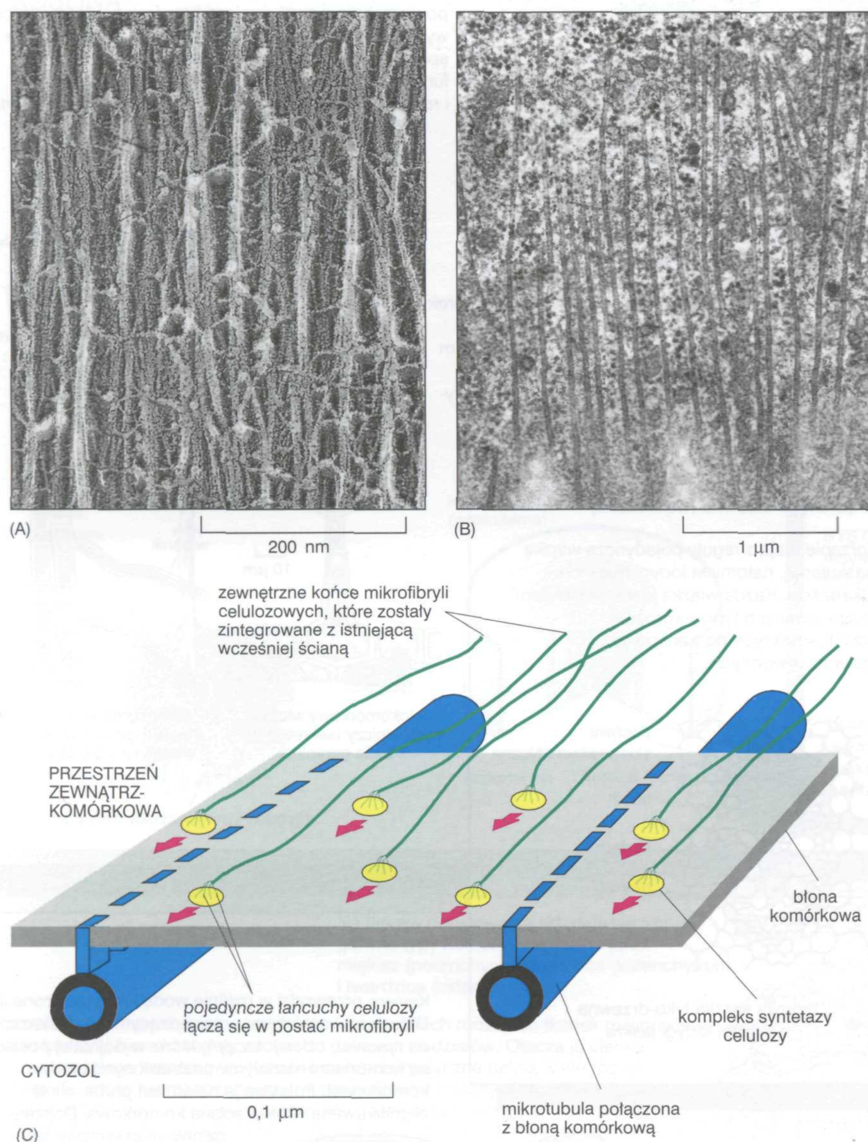
Floem bierze w roślinie udział w transporcie roztworów organicznych. Jego główne składowe (człony rurek sitowych – *przyp. tłum.*) są ustawione jeden nad drugim tworząc rurki, zwane *rurkami sitowymi*. Dojrzałe człony rurek sitowych są żywymi komórkami, które łączą się ze sobą poprzez sita w ich ścianach poprzecznych. Sita te powstały w wyniku powiększenia lub modyfikacji plazmodesm (płytki sitowe). Człony rurek sitowych zachowały swoją błonę komórkową, ale utraciły jądro komórkowe i większość cytoplazmy; aby więc istnieć i prawidłowo funkcjonować, muszą być ściśle połączone z komórkami towarzyszącymi. Komórki towarzyszące, poprzez sita w ścianie komórkowej, dodatkowo transportują płynne cząsteczki pokarmowe z członów rurek sitowych i do ich wnętrza.

Ksylem przewodzi w roślinie wodę i rozpuszczone jony. Głównymi komórkami przewodzącymi są, pokazane na rysunku, człony naczyń, które w dojrzałej postaci są komórkami martwymi, pozbawionymi błony komórkowej. Pokrywa je natomiast gruba, silnie zlignifikowana wtórna ściana komórkowa. Dojrzałe człony są częściowo lub zupełnie pozbawione ścian poprzecznych. Ponieważ są ustawione w pionowe szeregi, tworzą długie rury.



Człony naczyń są też ściśle powiązane z komórkami miękiszu drzewnego, które aktywnie transportują przez błonę komórkową niektóre roztwory z naczyń i do ich wnętrza.

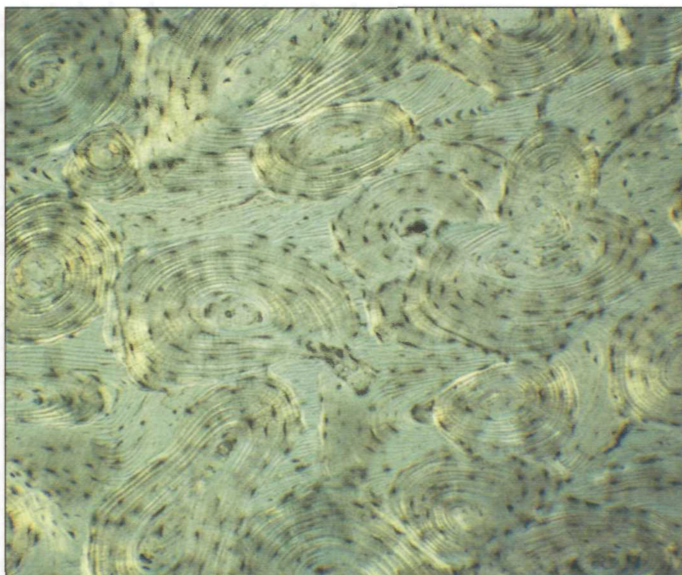




Rys. 19-7. Celuloza w ścianie komórki roślinnej jest odkładana w sposób uporządkowany. (A) Uporządkowany układ fibryl celulozowych w ścianie komórki roślinnej widoczny w mikroskopie elektronowym. (B) Uporządkowany układ mikrotubul leżących tuż pod błoną komórkową (mikrotubule korowe). (C) Jeden z modeli ilustrujących sposób, w jaki uporządkowany układ mikrotubul może warunkować podobne uporządkowanie mikrofibryl celulozowych nowo odłożonych na powierzchni komórki. Duże kompleksy enzymatyczne *syntetazy celulozy* są białkami integralnymi błony komórkowej, które w sposób ciągły syntetyzują mikrofibryle celulozowe na jej zewnętrznej powierzchni. Zewnętrzne (względem błony komórkowej) końce sztywnych mikrofibryl integrują się ze strukturą ściany, a wydłużanie się mikrofibryl, które zachodzi na przeciwnych końcach (przy błonie komórkowej), popycha kompleksy syntetaz wzdłuż płaszczyzny ściany. Ponieważ szeregi korowych mikrotubul są połączone z błoną komórkową w taki sposób, że ograniczają przemieszczanie się kompleksów enzymatycznych tylko do określonych torów, należy przyjąć, że układ mikrotubul korowych determinuje kierunek odkładania mikrofibryl. (Dzięki uprzejmości: A — Brian Wells, Keith Roberts; B — Brian Gunning)

tkanki łącznej. W tkankach łącznych substancja międzykomórkowa jest obfita i przenosi siły mechaniczne. W innych tkankach, takich jak nabłonki, substancja międzykomórkowa jest skąpa, a komórki są połączone ze sobą bezpośrednio i same przenoszą siły mechaniczne. Najpierw omówimy tkankę łączną.

Tkanki łączne zwierzęce są ogromnie zróżnicowane. Mogą być one mocne i elastyczne jak ścięgna lub skóra właściwa; twarde i spoiste jak kość; sprężyste i amortyzujące uderzenia jak chrząstka lub miękkie i przejrzyste jak galareta wypełniająca wnętrze oka. We wszystkich tych przykładach większość masy tkanki jest zajęta przez substancję międzykomórkową, a komórki wytwarzające tę substancję są w niej rozproszone jak rodzynki w cieście (rys. 19-8). Ponadto we wszystkich wymienionych tkankach łącznych wytrzymałość na rozciąganie jest zapewniona przez białko włókienkowe — **kolagen**, a nie przez polisacharydy, jak w przypadku roślin. Różne odmiany tkanki łącznej zawdzięczają swój specyficzny charakter posiadanemu rodzajowi kolagenu, jego ilości, i — co najważniejsze — innym cząsteczkom, które są tam wplecione w różnych proporcjach.



Rys. 19-8. Przekrój przez kość. Komórki widoczne są jako małe, ciemne, podobne do pająków obiekty zatopione w substancji kostnej, która zajmuje większą objętość tkanki i zapewnia całą jej mechaniczną wytrzymałość. Jasne albo ciemne pasma są pokładami tej substancji zawierającej uporządkowany układ kolagenu (uwidoczniony za pomocą światła spolaryzowanego). Kryształy fosforanów wapnia, wypełniające przestrzenie pomiędzy włókienkami kolagenu, nadają substancji kostnej odporność na zgniatanie, jak również naprężanie, podobnie jak żelazobeton

Kolagen zapewnia wytrzymałość na rozciąganie w zwierzęcych tkankach łącznych

Kolagen został wykazany we wszystkich organizmach wielokomórkowych i występuje w wielu odmianach. Ssaki mają ok. 20 genów kolagenu kodujących różne jego typy potrzebne w poszczególnych tkankach. Kolageny są głównymi białkami w kościach, ścięgnach i skórze (skóra garbowana jest wyprawionym kolagenem); stanowią one 25% całej masy białek w organizmie ssaków — więcej niż jakiekolwiek inne białko.

Charakterystycznymi cechami typowej cząsteczki kolagenu jest jej długość, sztywność oraz trójniciowa skręcona struktura, w której trzy łańcuchy polipeptydowe są nawinięte wokół siebie na kształt superhelikalnej liny (rys. 19-9). Cząsteczki te są następnie złożone w uprządkowane polimery, zwane *włókienkami kolagenowymi*, cienkie nitki o średnicy 10–300 nm i długości wielu mikrometrów, które mogą się łączyć w jeszcze grubsze *włókna kolagenowe* (patrz rys. 19-9). Inne cząsteczki kolagenu przyczepiają się do powierzchni włókienek kolagenowych i łączą je z innymi włókienkami oraz innymi składnikami substancji międzykomórkowej.

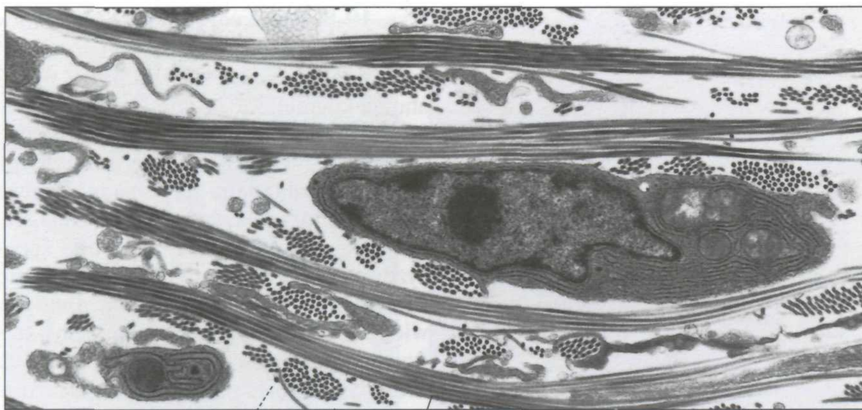
Komórki znajdujące się w tkance łącznej, wytwarzające substancję międzykomórkową, nazywamy różnie, zależnie od tkanki; w skórze, ścięgnach i wielu innych tkankach łącznych nazywamy je *fibroblastami* (rys. 19-10); w kości nazywamy je *osteoblastami*. Wytwarzają one zarówno kolagen, jak i inne składniki substancji międzykomórkowej. Prawie wszystkie te cząsteczki są syntetyzowane wewnątrz komórek i wydzielane na drodze egzocytozy. Na zewnątrz komórki są one montowane w wielkie, spójne agregaty. Jeżeli agregaty te powstawałyby jeszcze przed wydzieleniem, komórki zablokowałyby się własnymi produktami. W przypadku kolagenu komórka omija to niebezpieczeństwo dzięki sekrecji cząsteczek kolagenu w formie prekursorowej, zwanego *prokolagenem,* z dodatkowymi peptydami na końcach cząsteczki, zapobiegającymi agregacji we włókienka kolagenowe. Zewnątrzkomórkowy enzym — *kolagenaza* — odcina końcowe peptydy, co pozwala agregować cząsteczkom dopiero w przestrzeni pozakomórkowej.

U niektórych ludzi występuje genetyczny defekt kolagenazy powodujący nieprawidłowe składanie włókienek kolagenowych. W rezultacie, skóra i różne inne tkanki łączne mają zmniejszoną wytrzymałość i wykazują niezwykłą rozciągliwość (rys. 19-11).

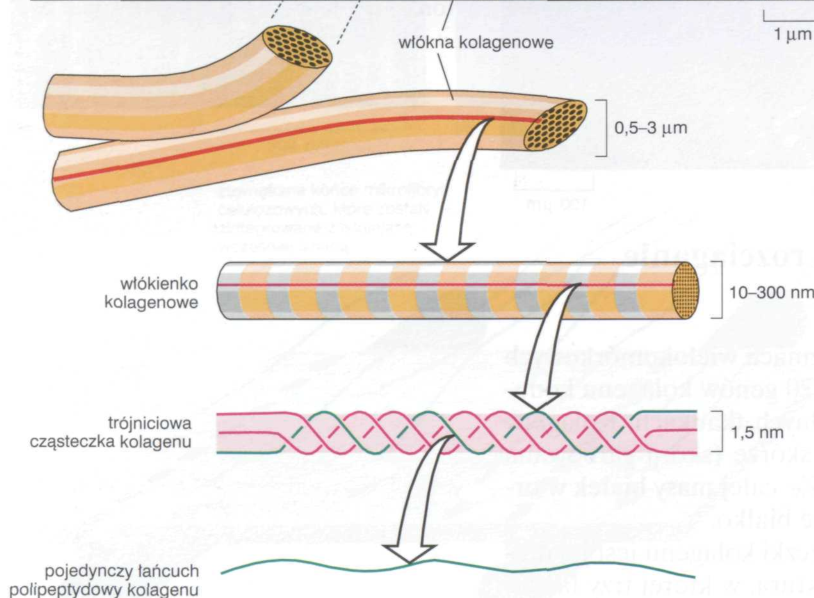
Pytanie 19-2. Mutacje w genach kodujących kolageny mają często poważne konsekwencje prowadzące do wielu wyniszczających chorób. Szczególnie groźne są mutacje zmieniające reszty glicyny, które są konieczne w każdej trzeciej pozycji łańcucha białkowego, aby łańcuchy te mogły się łączyć w charakterystyczne trójniciowe skręcone struktury.

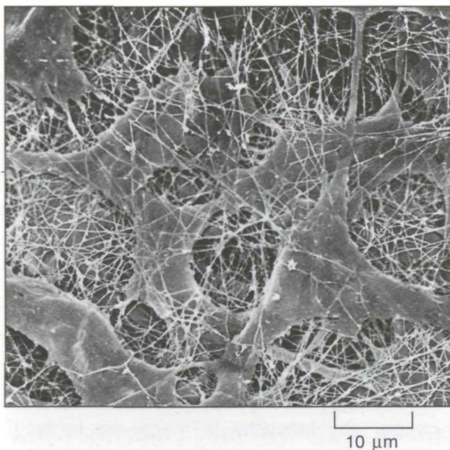
A. Czy przypuszczasz, że mutacje kolagenu są groźne, jeżeli tylko jedna z dwóch kopii genu kolagenu jest wadliwa?

B. Zagadkową obserwacją jest to, że zamiana reszt glicynowych w inne aminokwasy jest najbardziej szkodliwa, jeżeli występuje w pobliżu aminowego końca domen tworzących cząsteczkę kolagenu. Zaproponuj wytłumaczenie tego.

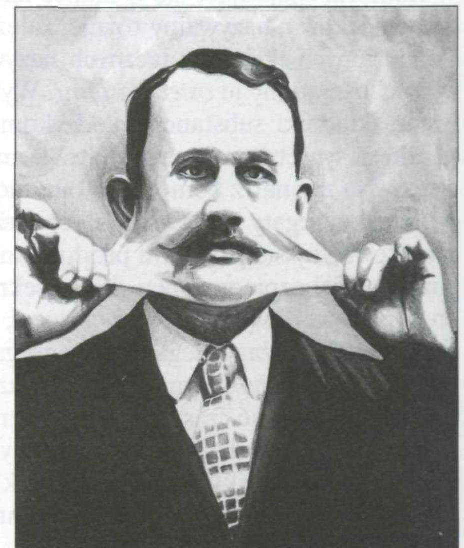


Rys. 19-9. Organizacja i struktura kolagenu. Mikrografia elektronowa pokazuje włókienka kolagenowe w tkance łącznej skóry embrionu pisklęcia. Włókienka są połączone w wiązki; niektóre biegną w płaszczyźnie skrawka, inne prawie pod kątem prostym. Komórka widoczna na zdjęciu jest fibroblastem, który wydziela kolagen oraz składniki substancji międzykomórkowej. Schemat pokazuje strukturę molekularną włókienek kolagenowych. (Zdjęcie z: C. Ploetz, E. I. Zycband, D. E. Birk, *J. Struct. Biol.* 106: 73–81, 1991)





Rys. 19-10. Skaningowa mikrografia elektronowa fibroblastów w tkance łącznej. Tkanka pochodzi z rogówki szczura. Substancja międzykomórkowa otaczająca fibroblasty składa się głównie z włókienek kolagenu. Pozostałe składniki formujące żel, wypełniający przestrzenie pomiędzy włókienkami kolagenowymi, usunięto za pomocą enzymów i kwasów. (Z: T. Nishida et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29: 1887–1890, 1988)

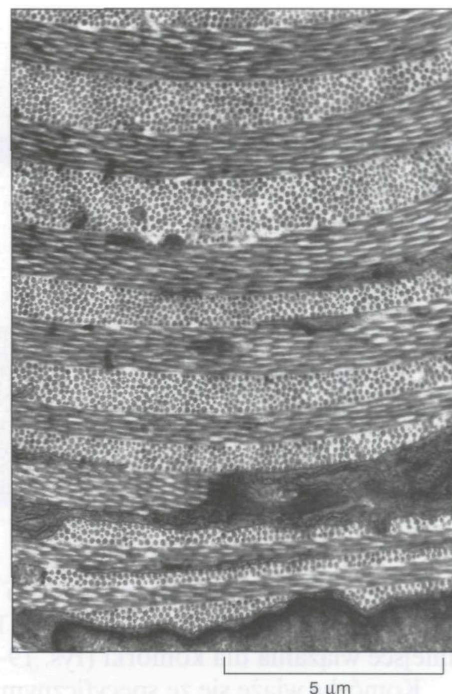


Rys. 19-11. Nadmiernie rozciągliwa skóra. James Morris, „mężczyzna o elastycznej skórze" z fotografii zrobionej ok. 1890 roku. Nienormalnie rozciągliwa skóra jest częścią zespołu genetycznego wynikającego z wadliwego składania lub krzyżowego łączenia kolagenu. U niektórych osobników wynika to z niedoboru kolagenazy przekształcającej prokolagen w kolagen

Komórki wydzielają i organizują kolagen

Aby móc spełniać swoje funkcje, włókienka kolagenowe muszą być prawidłowo zorganizowane. W skórze na przykład, są one splecione na wzór wikliny, a w sąsiadujących pokładach mają różny przebieg, tak aby tkanka była wytrzymała na rozciąganie w różnych kierunkach (rys. 19-12). W ścięgnach (które przymocowują mięśnie do kości) biegną one w równoległych pęczkach wzdłuż głównej osi rozciągania.

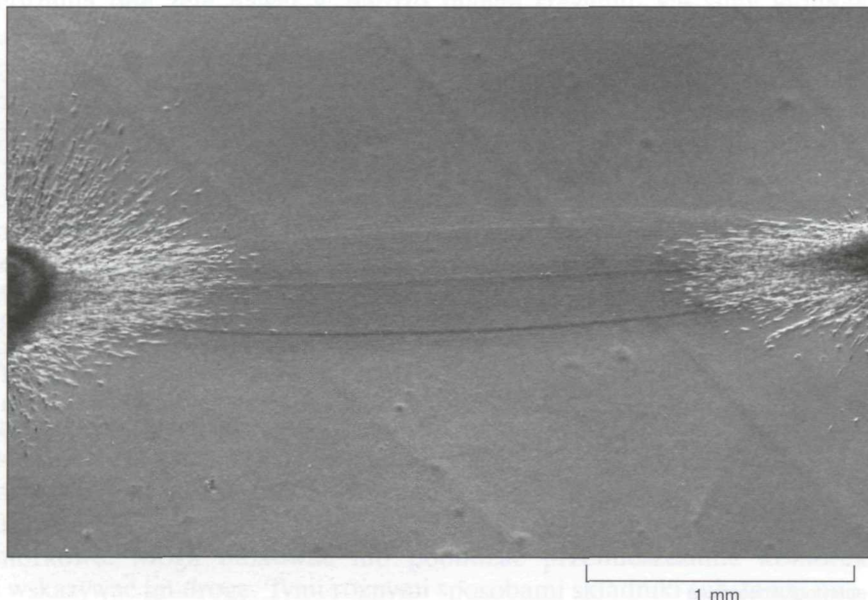
Tkanka łączna kontroluje rozmieszczenie kolagenu, częściowo przez odkładanie go w zorientowany sposób, częściowo dzięki późniejszej rearanżacji jego ułożenia. Podczas rozwoju tkanki fibroblasty „opracowują" kolagen, który same wydzielają; pełzają po nim i wciągają go — pomagając mu w upakowaniu w struktury błoniaste lub w tworzeniu włókien. Mechaniczna rola fibroblastów w formowaniu kolagenu została wyraźnie zaobserwowana w hodowlach komórkowych. Gdy fibroblasty zmieszano z przypadkowo rozrzuconą siecią włókienek kolagenowych tworzącą żel w płytce hodowlanej, fibroblasty pociągały tę sieć i wyciągały kolagen powodując jego zbijanie się. Jeżeli dwa małe kawałki tkanki embrionalnej, zawierającej fibroblasty, zostaną umieszczone daleko od siebie na żelu kolagenowym, to żel ten organizuje się w zbite pasmo ukierunkowanych włókien łączących oba fragmenty (rys. 19-13). Fibroblasty wywędrowują z obu fragmentów wzdłuż ukierunkowanych włókien kolagenowych. W ten sposób fibroblasty mają wpływ na wiązkę włókien kolagenowych, a włókna kolagenowe z kolei wpływają na rozmieszczenie fibroblastów. Fibroblasty prawdopodobnie odgrywają ważną rolę w tworzeniu długotrwałego uporządkowania substancji międzykomórkowej wewnątrz organizmu, tworząc np. ścięgna lub mocne, zbite blaszki tkanki łącznej otaczające i łączące ze sobą większość narządów.



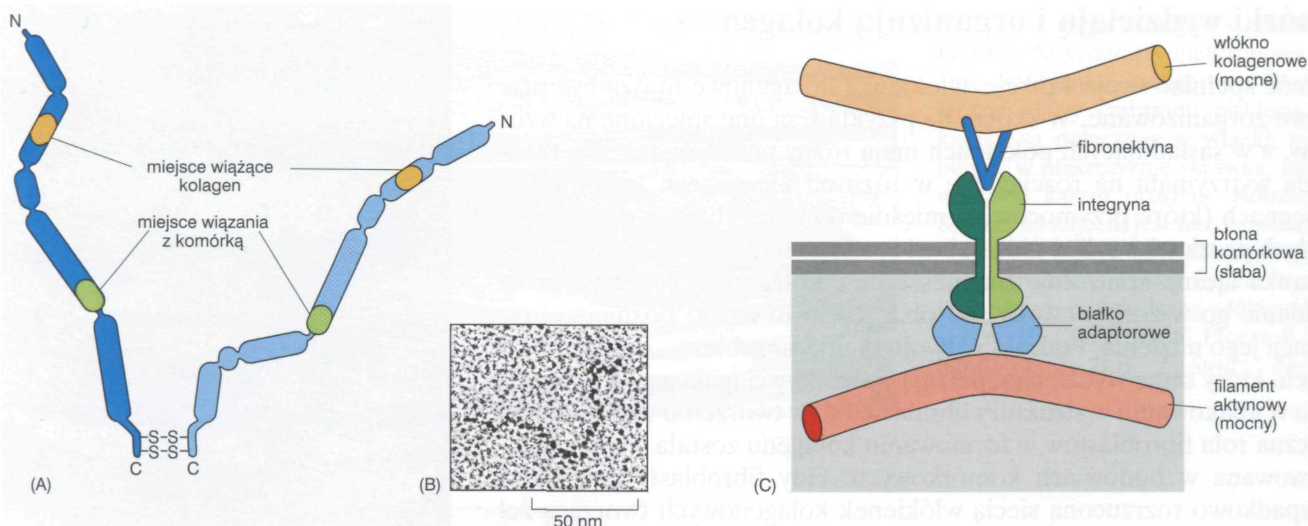
Rys. 19-12. Mikrografia elektronowa przekroju poprzecznego skóry kijanki. Zwróć uwagę na podobne jak w sklejce ułożenie włókienek kolagenowych, które w kolejnych warstwach przebiegają prawie pod kątem prostym do pozostałych (patrz także rys. 19-9). Taki układ spotyka się także w dojrzałych kościach i rogówce. (Dzięki uprzejmości: Jerome Gross)

Integryny łączą substancję międzykomórkową z cytoszkieletem wewnątrz komórek

Jeżeli komórki umieścimy na podłożu z substancji międzykomórkowej, to będą one pełzać, co oznacza, że potrafią przytwierdzać się do tej substancji. Komórki nie przytwierdzają się dobrze do samego kolagenu. Łączenie



Rys. 19-13. Formowanie kolagenu przez komórki. Mikrografia pokazuje okolicę między dwoma fragmentami tkanki embrionalnej serca pisklęcia (bogatej w fibroblasty, jak również komórki mięśniowe serca) rosnącymi w hodowli na żelu kolagenowym przez cztery dni. Zbite pasmo ukształtowanych włókien kolagenowych zostało uformowane pomiędzy fragmentami tkanek, prawdopodobnie w wyniku pociągania kolagenu przez fibroblasty znajdujące się w tych fragmentach tkankowych. (Z: D. Stopak, A. K. Harris, *Dev. Biol.* 90: 383–398, 1982)



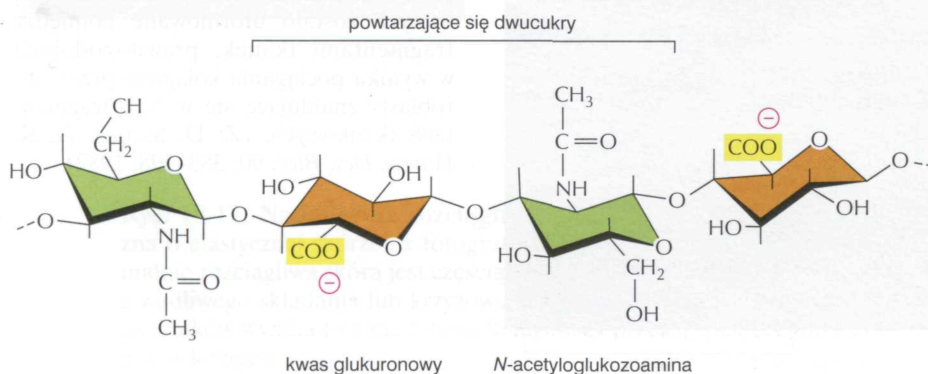
Rys. 19-14. Molekularne połączenie substancji międzykomórkowej z cytoszkieletem w komórce zwierzęcej. (A) Diagram i (B) mikrografia elektronowa cząsteczki fibronektyny. (C) Połączenie transbłonowe za pomocą cząsteczki integryny. Cząsteczka integryny przenosi naprężenia przez błonę komórkową; jest ona zakotwiczona wewnątrz komórki do cytoszkieletu i na zewnątrz, poprzez fibronektynę, do substancji międzykomórkowej. Sama błona komórkowa nie musi więc być mocna (B — z: J. Engel et al., *J. Mol. Biol*. 150: 97–120, 1981. Academic Press Inc. [London] Ltd.)

to zapewnia *fibronektyna*, inne białko substancji międzykomórkowej. Jeden fragment fibronektyny łączy się z kolagenem, a inny fragment tworzy miejsce wiązania dla komórki (rys. 19-14A).

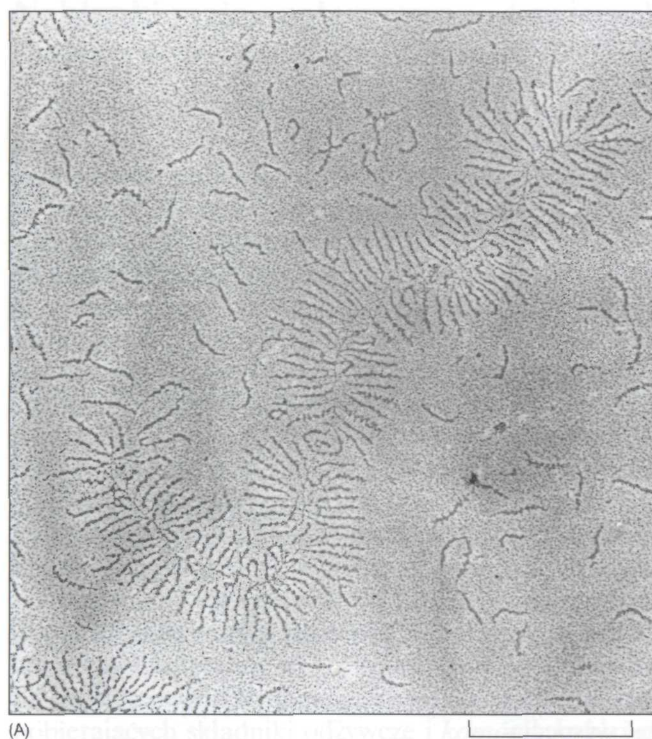
Komórka wiąże się ze specyficznymi miejscami na fibronektynie za pomocą białka receptorowego, zwanego *integryną*, które przenika przez błonę komórkową. Domena zewnątrzkomórkowa integryny przyłącza się do fibronektyny, a druga domena cząsteczki integryny, znajdująca się w cytoplazmie, tworzy miejsce wiążące filamenty aktynowe. W ten sposób, zamiast rozerwania błony komórkowej w czasie naprężeń między komórką a substancją międzykomórkową, cząsteczka integryny przenosi napięcie z kolagenu na cytoszkielet (rys. 19-14C). Komórki mięśniowe w podobny sposób łączą swoje aparaty kurczliwe z substancją międzykomórkową ścięgien, umożliwiając im dużą odporność na siły mechaniczne, natomiast same komórki są pokryte bardzo cienką dwuwarstwową błoną lipidową.

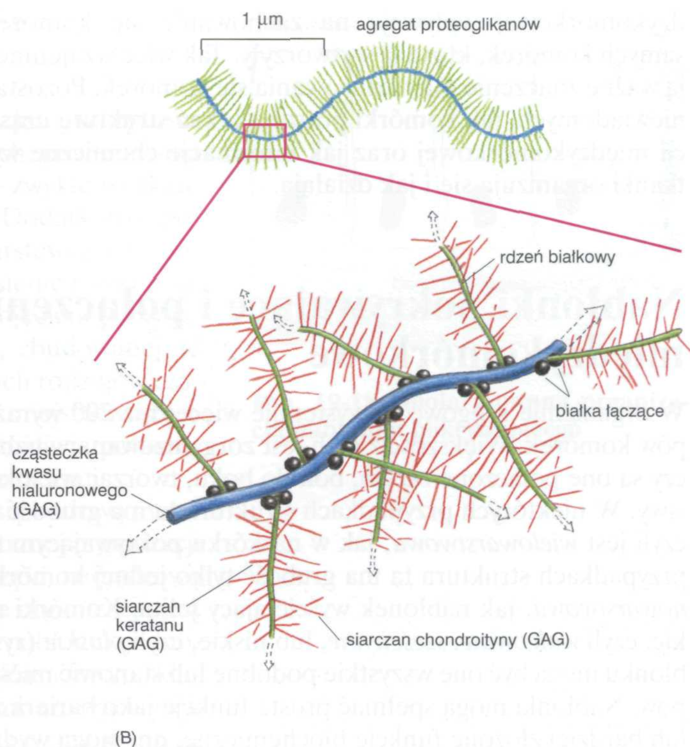
Żel polisacharydowy i białkowy wypełnia wolne przestrzenie i zapobiega kompresji

Kolagen zapewnia wytrzymałość na rozciąganie, a inne rodzaje makrocząsteczek w substancji międzykomórkowej zwierząt, pełniące funkcje pomocnicze, zapobiegają kompresji i służą do wypełniania wolnych przestrzeni. Są to *proteoglikany*, białka pozakomórkowe związane ze specjalną grupą złożonych, ujemnie naładowanych polisacharydów, **glikozoaminoglikanów (GAG)** (rys. 19-15). Proteoglikany różnią się bardzo długością, kształtem i budową chemiczną. Najczęściej wiele łańcuchów



Rys. 19-15. Kwas hialuronowy, stosunkowo prosty GAG. Składa się z pojedynczego długiego łańcucha do 25000 powtarzających się jednostek dwucukrowych, z których każda jest naładowana ujemnie. Jak w innych cząsteczkach GAG, jeden z cukrów w każdej jednostce dwucukru jest aminocukrem. Wiele GAG ma dodatkowe ujemnie naładowane boczne grupy, szczególnie grupy siarczanowe





cząsteczek GAG jest dołączonych do pojedynczego rdzenia białkowego, który może być z kolei połączony swoim końcem do innej cząsteczki GAG, tworząc olbrzymie, przypominające szczotkę do butelki makrocząsteczki, mające masę cząsteczkową wielu milionów Da (rys. 19-16).

W zbitych, zwartych tkankach łącznych, takich jak ścięgno i kość, część cząsteczki GAG ma małą masę cząsteczkową i substancja międzykomórkowa składa się prawie w całości z kolagenu (lub, w przypadku kości, kolagenu i kryształów fosforanów wapnia). W innej skrajności substancja galaretowata wewnątrz oka składa się prawie w całości z jednego szczególnego typu GAG i wody, z niewielką ilością kolagenu. Ogólnie, GAG są silnie hydrofilowe i zwykle przybierają mocno wydłużone konfiguracje, które zajmują dużą objętość w stosunku do ich masy (patrz rys. 19-16). Formują one żele nawet w bardzo małym stężeniu, ich silny ładunek ujemny przyciąga kationy, takie jak Na^+, które są silnie aktywne osmotycznie, co powoduje wiązanie dużej ilości wody w substancji międzykomórkowej. Zwiększa to ciśnienie osmotyczne, które jest wyrównywane przez napięcie we włóknach kolagenowych, zmieszanych z proteoglikanami. Gdy substancja międzykomórkowa jest bogata w kolagen, a w jego oczkach znajdują się duże ilości cząsteczek GAG, to ciśnienie osmotyczne i wyrównujące napięcie są olbrzymie. W ten sposób substancja międzykomórkowa jest twarda, sprężysta i oporna na ściskanie. Taki charakter ma na przykład substancja międzykomórkowa chrząstki pokrywająca staw kolanowy, która może utrzymać nacisk setek kilogramów na centymetr kwadratowy.

Proteoglikany spełniają wiele skomplikowanych funkcji, oprócz zwyczajnego wytwarzania uwodnionej przestrzeni wokół komórek. Mogą one tworzyć żele o różnych oczkach i ładunku, i działają jak filtry regulujące przechodzenie cząsteczek przez środowisko zewnątrzkomórkowe. Mogą one wiązać czynniki wzrostu i inne białka służące jako sygnały międzykomórkowe. Mogą blokować lub pobudzać przemieszczanie komórek i wskazywać im drogę. Tymi różnymi sposobami składniki substancji mię-

Rys. 19-16. Agregat proteoglikanów z chrząstki. (A) Mikrografia elektronowa agregatu rozciągniętego na płaskiej powierzchni. Widocznych jest także wiele wolnych podjednostek (każda z nich jest cząsteczką proteoglikanu). (B) Schematyczny rysunek olbrzymiego agregatu zilustrowanego na (A) pokazuje połączenia cząsteczek GAG i białek. Masa cząsteczkowa takiego kompleksu może wynosić 10^8 lub więcej i zajmuje objętość równą bakterii, co wynosi $2 \cdot 10^{-12}$ cm^3 (A — dzięki uprzejmości: Lawrence Rosenberg)

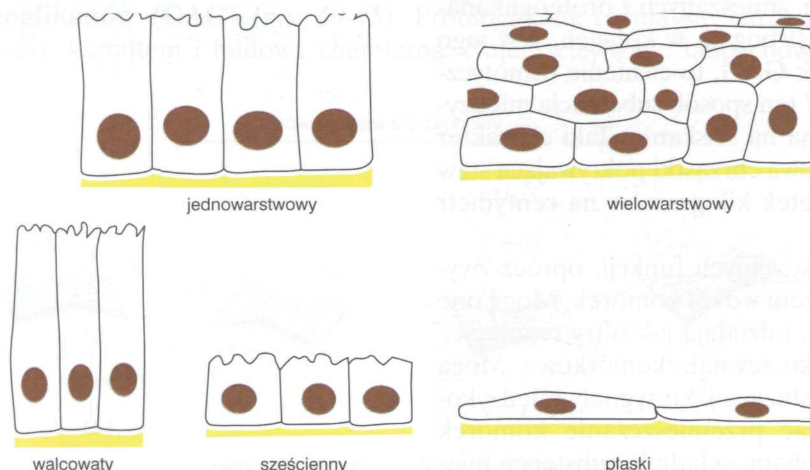
dzykomórkowej wpływają na zachowanie się komórek, często tych samych komórek, które ją wytworzyły. Tak więc wzajemne interakcje mają ważne znaczenie dla różnicowania się komórek. Pozostaje jeszcze wiele niewiadomych, jak komórki potrafią utkać strukturę cząsteczek substancji międzykomórkowej oraz jak informacje chemiczne wychodzące z tej tkanki organizują się i jak działają.

Pytanie 19-3. Proteoglikany charakteryzują duże ilości ładunków ujemnych w grupach cukrowych. Jak różniłyby się właściwości tych składników, gdyby ładunki ujemne nie były tak liczne?

Nabłonki pokrywające i połączenia międzykomórkowe

W organizmie kręgowców występuje więcej niż 200 wyraźnie różnych typów komórek. Większość z nich jest zorganizowana w nabłonki — to znaczy są one połączone razem, bok do boku, tworząc wielokomórkowe warstwy. W niektórych przypadkach struktura ta ma grubość wielu komórek, czyli jest *wielowarstwowa*, jak w naskórku pokrywającym skórę; w innych przypadkach struktura ta ma grubość tylko jednej komórki, czyli jest *jednowarstwowa*, jak nabłonek wyścielający jelita. Komórki mogą być wysokie, czyli *walcowate*, *sześcienne*, lub niskie, czyli *płaskie* (rys. 19-17). W nabłonku mogą być one wszystkie podobne lub stanowić mieszaninę wielu typów. Nabłonki mogą spełniać proste funkcje jako bariera zabezpieczająca lub bardziej złożone funkcje biochemiczne, np. mogą wydzielać wyspecjalizowane produkty, jak hormony, mleko lub łzy; mogą służyć do resorpcji składników odżywczych, jak w nabłonku jelitowym; lub mogą wykrywać sygnały, jak np. fotoreceptory w oku lub komórki rzęsate w uchu. Mimo tych i wielu innych różnic czynnościowych, można rozpoznać klasyczny zespół cech strukturalnych, który praktycznie dotyczy wszystkich nabłonków zwierzęcych. Nabłonkowy układ komórek jest tak typowy, że nie zawsze jest dostrzeżony. Wymaga on jednak zespołu specjalistycznych struktur, wspólnych dla różnorodnych typów komórek, co omówimy dalej.

Nabłonki pokrywają zewnętrzną powierzchnię ciała i wyściełają wszystkie jego jamy wewnętrzne, co musiało być wczesną cechą w ewolucji zwierząt wielokomórkowych. Znaczenie tych nabłonków jest oczywiste. Komórki połączone razem w warstwę nabłonkową tworzą barierę, która ma takie samo znaczenia dla organizmu wielokomórkowego, jak błona komórkowa dla pojedynczej komórki. Utrzymuje ona pewne cząsteczki wewnątrz, a inne na zewnątrz, pobiera substancje odżywcze i usuwa substancje odpadowe, zapobiega utracie płynów, zawiera receptory dla sygnałów ze środowiska oraz ochrania wnętrze organizmu przed atakującymi mikroorganizmami.

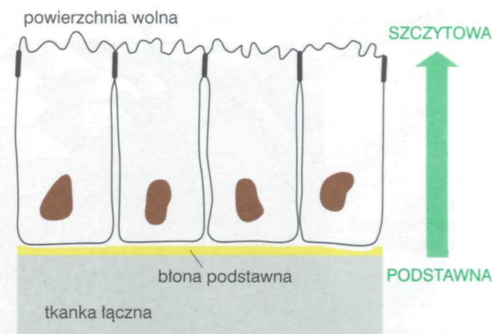


Rys. 19-17. Różne sposoby ułożenia (upakowania) komórek tworzących nabłonki pokrywające

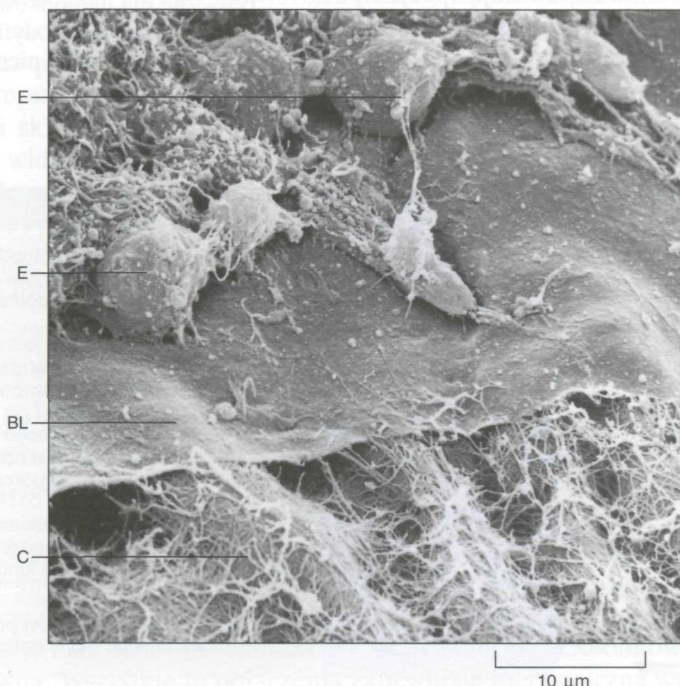
Nabłonki mają spolaryzowane powierzchnie i spoczywają na błonie podstawnej

Nabłonki pokrywające mają dwie powierzchnie: powierzchnia **szczytowa** jest wolna i zwrócona do powietrza lub płynów wodnistych; powierzchnia **podstawna** spoczywa na niektórych innych tkankach — zwykle na tkance łącznej, do której jest przytwierdzona (rys. 19-18). Dodatkowo, powierzchnia podstawna spoczywa na cienkiej i mocnej warstewce substancji międzykomórkowej, zwanej **błoną podstawną** (określenie błona podstawna jest nazwą zwyczajową i nie ma nic wspólnego z pojęciem błony jako dwuwarstwy lipidowej — *przyp. tłum.*) (rys. 19-19), zbudowanej ze specjalnego typu kolagenu (kolagen typu IV) i wielu innych rodzajów cząsteczek. Tu należy wymienić białko *lamininę*, która ma miejsca wiążące cząsteczki integryny błony komórek nabłonkowych i umożliwia połączenia podobne do tych, jakie tworzy fibronektyna w tkance łącznej.

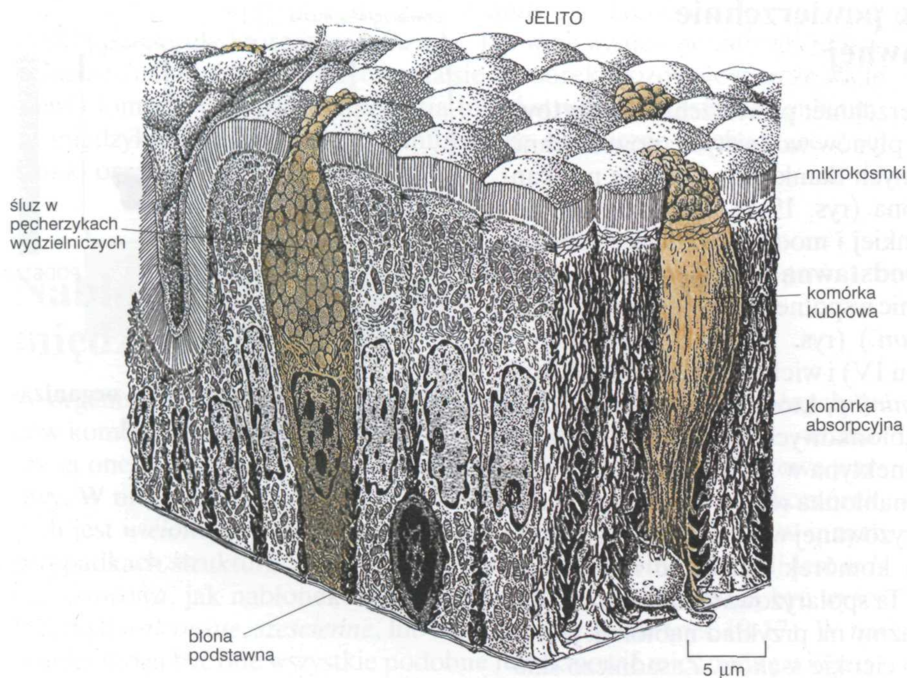
Powierzchnia szczytowa i podstawna nabłonka różnią się budową molekularną, będąc zarazem odbiciem spolaryzowanej wewnętrznej organizacji komórek nabłonkowych; każda z tych komórek ma część nadjądrową i podjądrową o różnych właściwościach. Ta spolaryzowana organizacja jest decydująca dla funkcji nabłonka. Rozważmy na przykład nabłonek jednowarstwowy walcowaty wyściełający jelito cienkie ssaków. Zasadniczo składa się on z dwóch wymieszanych typów komórek; *komórek absorpcyjnych* pobierających składniki odżywcze i *komórek kubkowych* (zwanych tak ze względu na ich kształt) wydzielających śluz, ochraniający i nawilżający powierzchnię jelit (rys. 19-20). Oba typy komórek są spolaryzowane. Komórki absorpcyjne pobierają składniki odżywcze przez powierzchnię szczytową ze światła jelita i przekazują je przez powierzchnię podstawną do tkanek podścieliska. Aby to wykonać, potrzebują różnych zestawów błonowych białek transportujących w błonie szczytowej i podstawnej (patrz s. 381). Komórki kubkowe są także spolaryzowane, choć w inny sposób; muszą one syntetyzować śluz i potem wydzielić go tylko na powierzchni szczytowej (patrz rys. 19-20). Dlatego też aparat Golgiego, pęcherzyki wydzielnicze i cytoszkielet są rozmieszczone asymetrycznie. Chociaż pozostaje



Rys. 19-18. Spolaryzowana organizacja nabłonka pokrywającego



Rys. 19-19. Skaningowa mikrografia elektronowa błony podstawnej rogówki embrionu kurczęcia. Niektóre komórki nabłonkowe (E) zostały usunięte w celu pokazania górnej powierzchni dywanikowatej błony podstawnej utkanej z kolagenu typu IV (BL). Sieć włókienek kolagenu innego typu (C) w tkance łącznej podścieliska współdziała z dolną powierzchnią blaszki. (Dzięki uprzejmości: Robert Trelstad)



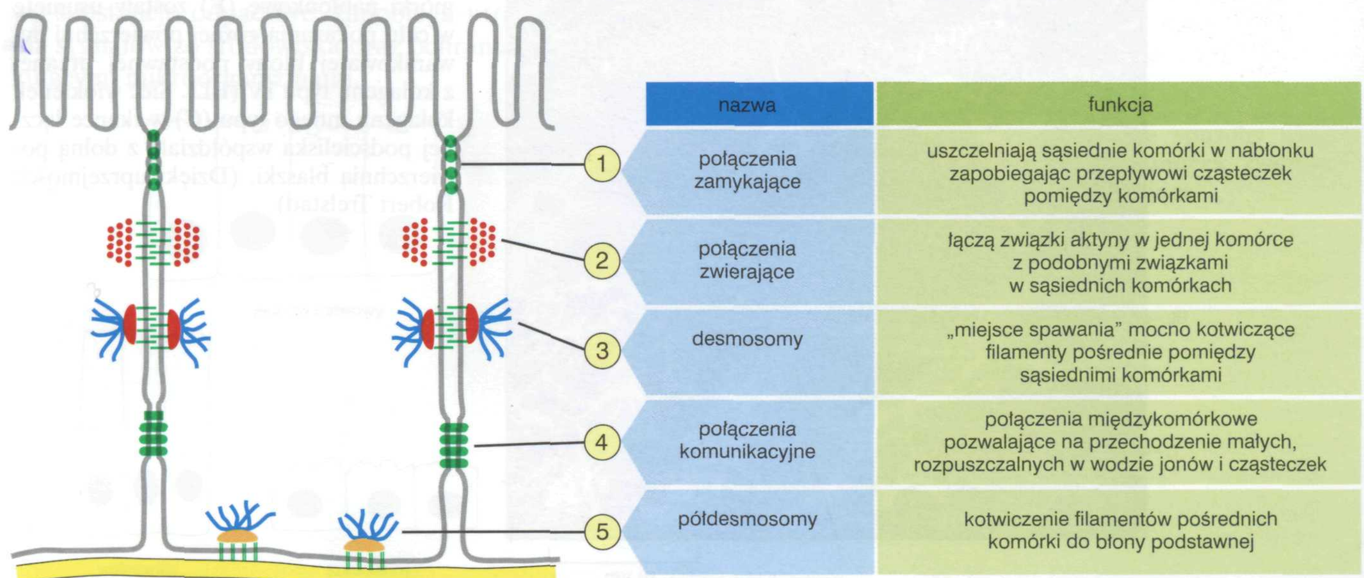
Rys. 19-20. Czynnościowo spolaryzowane typy komórek w nabłonku jelita. Komórki absorpcyjne, które pobierają składniki pokarmowe z jelita, są zestawione w nabłonku jelita z komórkami kubkowymi, które wydzielają śluz do jelita. Komórki absorpcyjne są często zwane także komórkami z rąbkiem szczoteczkowym, z powodu szczoteczkowatej masy mikrokosmków na ich powierzchni szczytowej, co służy zwiększeniu powierzchni błony czynnej do transportu małych cząsteczek do komórki. Komórki kubkowe mają kształt kielichowaty, gdyż liczne pęcherzyki wydzielnicze rozszerzają ich część szczytową. (Zadaptowano z: R. Krstić, Human Microscopic Anatomy. Berlin: Springer, 1991)

jeszcze wiele pytań, co do sposobu utrzymania takiej organizacji organelli komórkowych, to jest jasne, że zależy ona od połączeń formowanych przez komórki nabłonkowe z innymi komórkami i błoną podstawną.

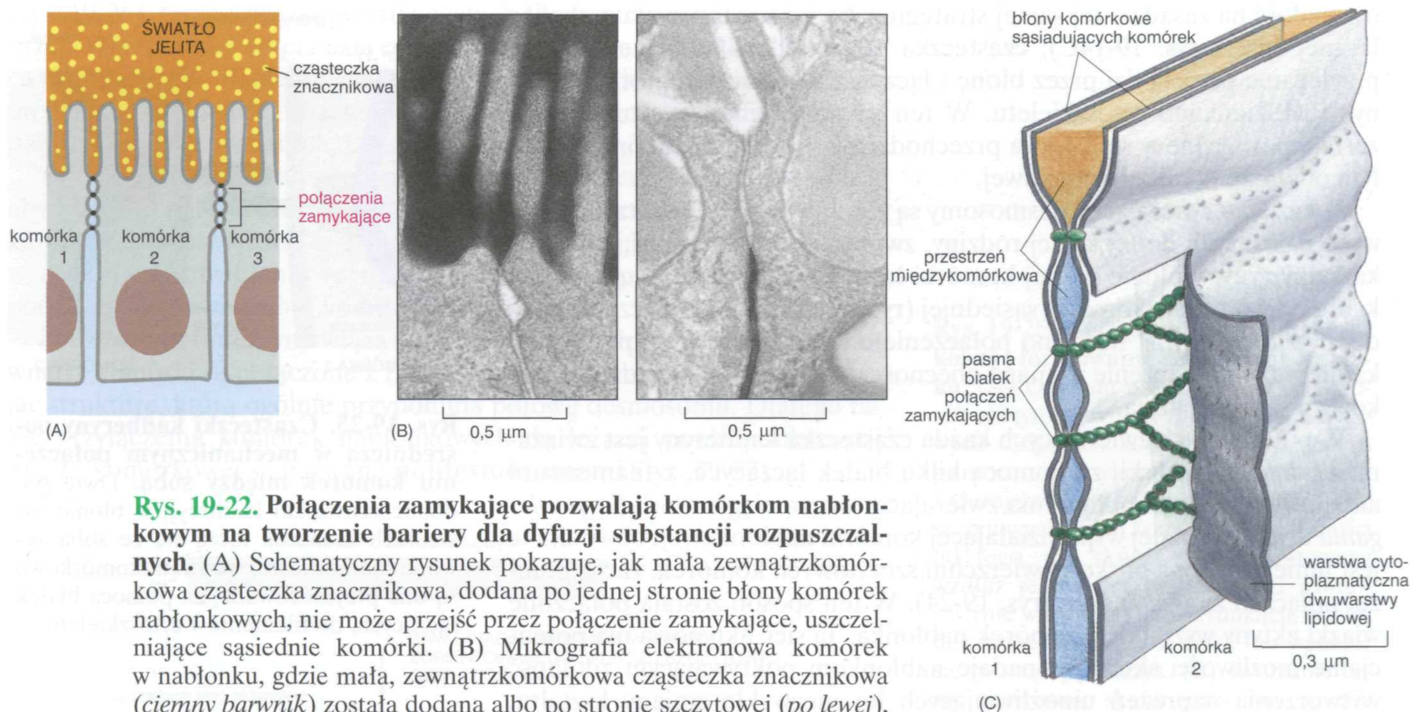
Połączenia zamykające powodują szczelność nabłonka i oddzielają powierzchnie szczytowe oraz podstawne

Połączenia komórek nabłonkowych można klasyfikować w zależności od ich funkcji. Niektóre zapewniają uszczelnienie zapobiegające przepływowi cząsteczek przez szczeliny między komórkami; inne zapewniają silne mechaniczne powiązanie komórek; jeszcze inne zapewniają specjalny rodzaj bliskiego kontaktowania chemicznego. W większości nabłonków wszystkie typy połączeń występują razem (rys. 19-21).

Rys. 19-21. Diagram zbiorczy głównych rodzajów połączeń międzykomórkowych wykazanych w nabłonku zwierząt. Połączenia zamykające są charakterystyczne dla nabłonków; inne typy występują także, w zmodyfikowanej formie, w różnych tkankach nienabłonkowych



	nazwa	funkcja
1	połączenia zamykające	uszczelniają sąsiednie komórki w nabłonku zapobiegając przepływowi cząsteczek pomiędzy komórkami
2	połączenia zwierające	łączą związki aktyny w jednej komórce z podobnymi związkami w sąsiednich komórkach
3	desmosomy	„miejsce spawania" mocno kotwiczące filamenty pośrednie pomiędzy sąsiednimi komórkami
4	połączenia komunikacyjne	połączenia międzykomórkowe pozwalające na przechodzenie małych, rozpuszczalnych w wodzie jonów i cząsteczek
5	półdesmosomy	kotwiczenie filamentów pośrednich komórki do błony podstawnej



Rys. 19-22. Połączenia zamykające pozwalają komórkom nabłonkowym na tworzenie bariery dla dyfuzji substancji rozpuszczalnych. (A) Schematyczny rysunek pokazuje, jak mała zewnątrzkomórkowa cząsteczka znacznikowa, dodana po jednej stronie błony komórek nabłonkowych, nie może przejść przez połączenie zamykające, uszczelniające sąsiednie komórki. (B) Mikrografia elektronowa komórek w nabłonku, gdzie mała, zewnątrzkomórkowa cząsteczka znacznikowa (*ciemny barwnik*) została dodana albo po stronie szczytowej (*po lewej*), albo po stronie podstawno-bocznej (*po prawej*); w obu przypadkach znacznik jest zatrzymany przez połączenie zamykające. (C) Model budowy połączenia zamykającego, pokazujący, jak prawdopodobnie dochodzi do uszczelnienia komórek przez białka zewnętrznej blaszki dwuwarstwy lipidowej błon komórkowych. (B dzięki uprzejmości: Daniel Friend)

Funkcję uszczelniającą spełniają **połączenia zamykające** (ang. ***tight junction*** — połączenia ścisłe, połączenia barierowe). Uszczelnienie sąsiadujących ze sobą komórek polega na tym, że cząsteczki rozpuszczalne w wodzie nie mogą łatwo wpływać między komórki. Jeżeli dodamy cząsteczkę znacznikową na jedną z powierzchni błony komórek nabłonkowych, to zwykle nie będzie ona przechodziła poza połączenie zamykające (rys. 19-22). Bez połączeń zamykających zapobiegających przepływowi, aktywność „pompująca" komórek absorpcyjnych, takich jak w jelicie, byłaby daremna i skład środowiska po obu stronach nabłonka stałby się identyczny. Jak widzieliśmy w rozdz. 11, połączenia zamykające odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu polarności poszczególnych komórek nabłonka; kompleks połączeń zamykających, tworząc obwódkę dookoła części szczytowej każdej z komórek, zapobiega przemieszczaniu się białek błonowych, aby utrzymać różnice w szczytowej i podstawnej (podstawno-bocznej) powierzchni (patrz rys. 11-37).

Połączenia międzykomórkowe związane z cytoszkieletem łączą silnie komórki ze sobą i z błoną podstawną

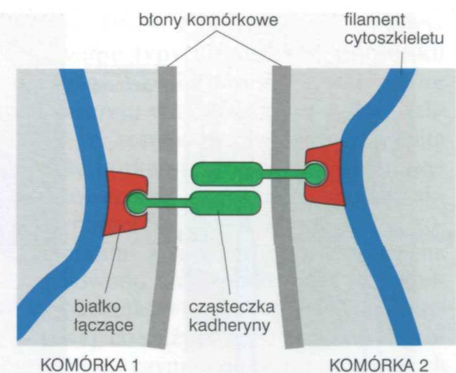
Występują trzy typy połączeń utrzymujących ciągłość nabłonka za pomocą przyczepów mechanicznych. *Połączenia zwierające* (ang. adherens junctions, połączenia mechaniczne) i *desmosomy* łączą komórki nabłonkowe między sobą, natomiast *półdesmosomy* łączą komórki nabłonkowe z błoną podstawną. Wszystkie te połączenia zapewniają mechaniczną wy-

trzymałość na zasadzie tej samej strategii, jaka już występowała w tkance łącznej (patrz rys. 19-14C); cząsteczka odpowiedzialna za zewnętrzne przyleganie przechodzi przez błonę i łączy się wewnątrz komórki z mocnymi włókienkami cytoszkieletu. W ten sposób filamenty cytoszkieletu zostają powiązane w sieć, która przechodzi z komórki na komórkę na całym obszarze tkanki nabłonkowej.

Połączenia zwierające i desmosomy są zbudowane z białek transbłonowych należących do tej samej rodziny, zwanych **kadherynami**; cząsteczka kadheryny w błonie jednej komórki łączy się z identyczną cząsteczką kadheryny w błonie komórki sąsiedniej (rys. 19-23). Takie połączenie „podobny z podobnym" nazwano połączeniem *homofilowym*. W przypadku kadheryn ich połączenie wymaga obecności Ca^{2+} w płynie międzykomórkowym — stąd nazwa.

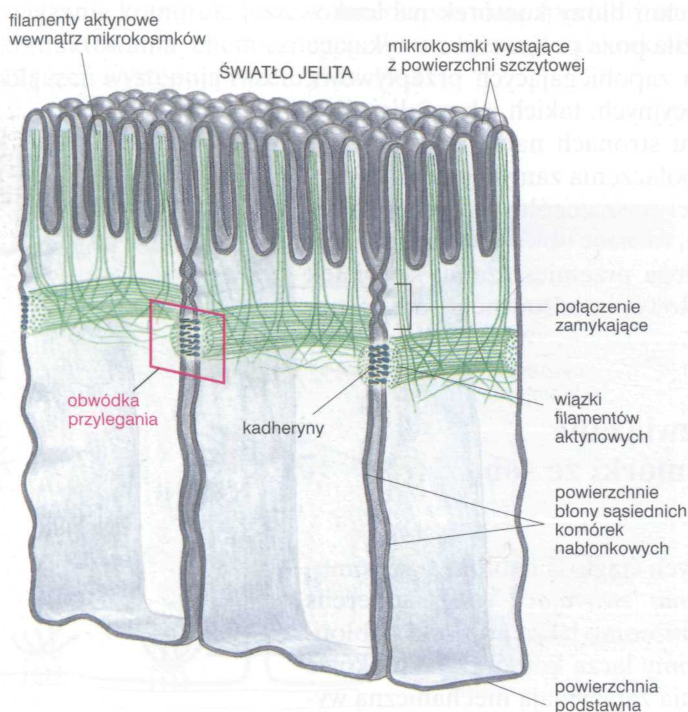
W połączeniach zwierających każda cząsteczka kadheryny jest związana wewnątrz komórki, za pomocą kilku białek łączących, z filamentami aktynowymi. Często połączenia zwierające tworzą ciągłą *obwódkę przylegania* dookoła każdej współdziałającej komórki nabłonkowej; obwódka ta jest umiejscowiona blisko powierzchni szczytowych komórek, zaraz poniżej połączeń zamykających (rys. 19-24). W ten sposób zostają połączone wiązki aktyny wszystkich komórek nabłonka. Ta sieć aktynowa ma potencjalne możliwości skurczu i nadaje nabłonkom pokrywającym zdolność wytworzenia naprężeń umożliwiających im niezwykłe zmiany kształtu. Kurczenie się części szczytowych wzdłuż jednej osi może wyginać nabłonek tak, że zwinie się on sam w cewę (rys. 19-25A). Ewentualnie kurczenie się części szczytowych równocześnie wzdłuż dwóch osi może wytworzyć miseczkowatą wklęsłość i ostatecznie pęcherzyk odrywający się od reszty nabłonka. Te ruchy nabłonka są ważne w rozwoju embrionalnym, gdzie wytwarzają one takie struktury, jak cewa nerwowa (zawiązek ośrodkowego układu nerwowego) (rys. 19-25B) i pęcherzyk soczewki (zawiązek soczewki oka) (rys. 19-25C).

W desmosomach inne typy cząsteczek kadheryny są zakotwiczone wewnątrz każdej komórki do filamentów pośrednich — dokładniej do cytokeratyn, które budują filamenty pośrednie w nabłonkach (patrz rozdz. 16)



Rys. 19-23. Cząsteczki kadheryny pośredniczą w mechanicznym połączeniu komórek między sobą. Dwie podobne cząsteczki kadheryn w błonie sąsiednich komórek łączą się ze sobą zewnątrzkomórkowo; wewnątrzkomórkowo są one przymocowane, za pomocą białek łączących, do filamentów cytoszkieletu

Pytanie 19-4. Analogami półdesmosomów są przyczepy ogniskowe (kontakt lokalny), opisane w rozdz. 16, które znajdują się w miejscach, gdzie komórka przylega do substancji międzykomórkowej. Połączenia te są powszechne w fibroblastach, lecz na ogół nie ma ich w komórkach nabłonkowych. Z drugiej strony, półdesmosomy są powszechne w komórkach nabłonkowych, lecz nie ma ich w fibroblastach. W przyczepach ogniskowych wewnątrzkomórkowe połączenie dotyczy cytoszkieletu aktynowego, natomiast w półdesmosomach dotyczy filamentów pośrednich. Jak przypuszczasz, dlaczego te dwa odmienne typy komórek przyczepiają się w różny sposób do substancji międzykomórkowej?

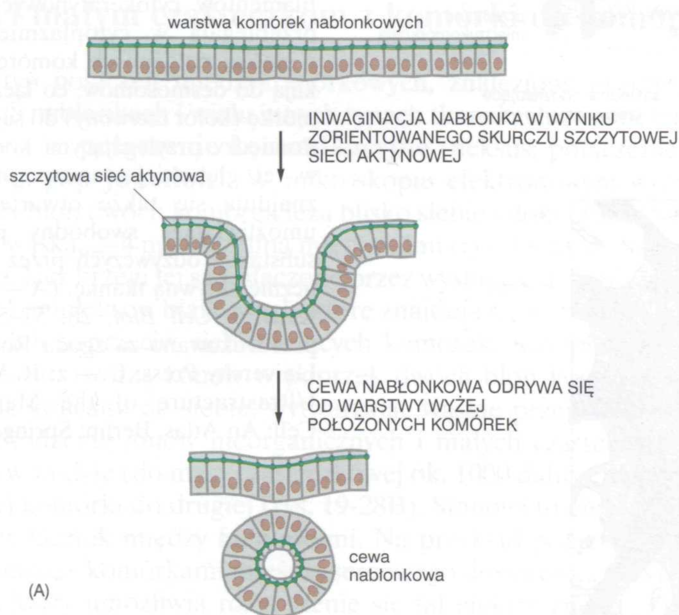


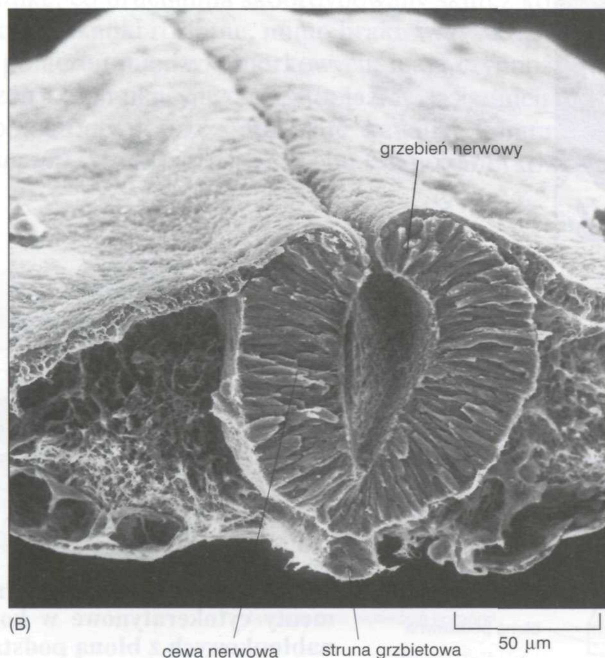
Rys. 19-24. Obwódki przylegania w komórkach nabłonkowych jelita cienkiego. Kurczliwe wiązki filamentów aktynowych biegną wzdłuż cytoplazmatycznych powierzchni błon komórkowych w okolicy szczytowej każdej komórki; te wiązki włókienek aktynowych w sąsiednich komórkach są połączone między sobą za pomocą cząsteczek kadheryn łączących błony komórkowe (patrz rys. 19-23)

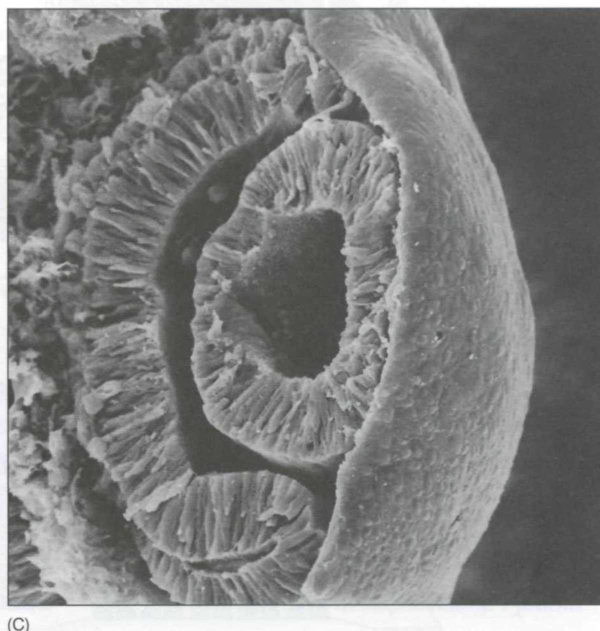
(rys. 19-26). Grube wiązki powrózowatych filamentów cytokeratynowych przecinają wzdłuż i wszerz całą cytoplazmę i spawają miejscowo za pomocą desmosomów filamenty cytokeratynowe sąsiednich komórek, nadając im dużą wytrzymałość. Wiązki te są szczególnie gęsto ułożone w mocnych nabłonkach pokrywających, jak np. w naskórku.

Pęcherze na skórze są „bolesnym przypomnieniem", że nie wystarcza, aby komórki nabłonkowe były mocno ze sobą połączone: muszą być także dobrze zakotwiczone w tkance podścieliskowej. Jak już zaznaczono wcześniej, zakotwiczenie to umożliwiają integryny zawarte w błonach podstawnych powierzchni komórek nabłonkowych.

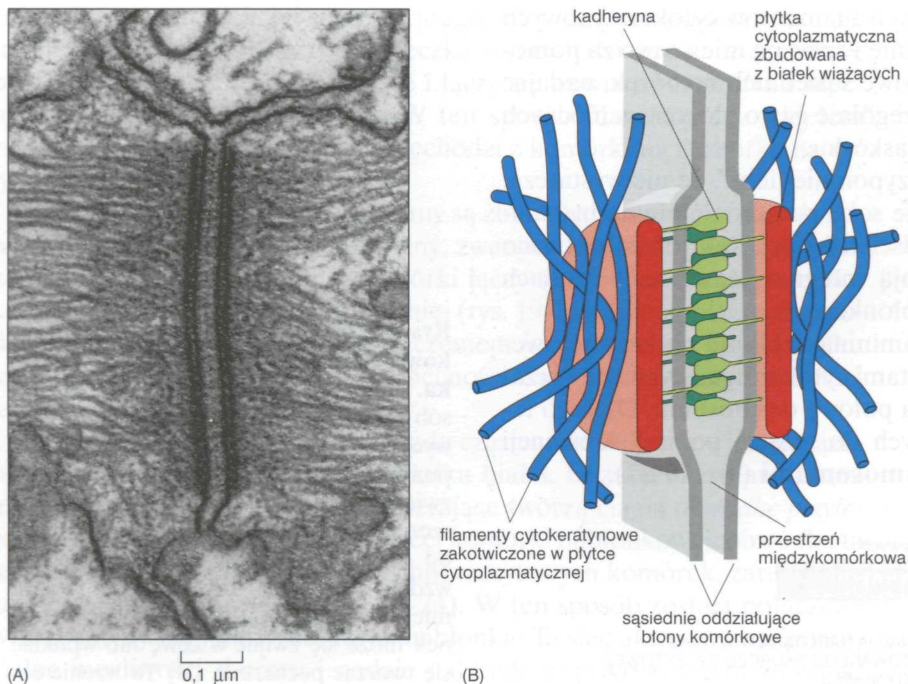
Na zewnątrz integryny wiążą się z lamininą w błonie podstawnej; wewnątrz komórki są połączone z filamentami cytokeratynowymi wytwarzając strukturę, która ogólnie przypomina połowę desmosomu. Dlatego takie przyłączenia komórek nabłonkowych do leżącej poniżej substancji międzykomórkowej są nazwane **półdesmosomami** (rys. 19-27).



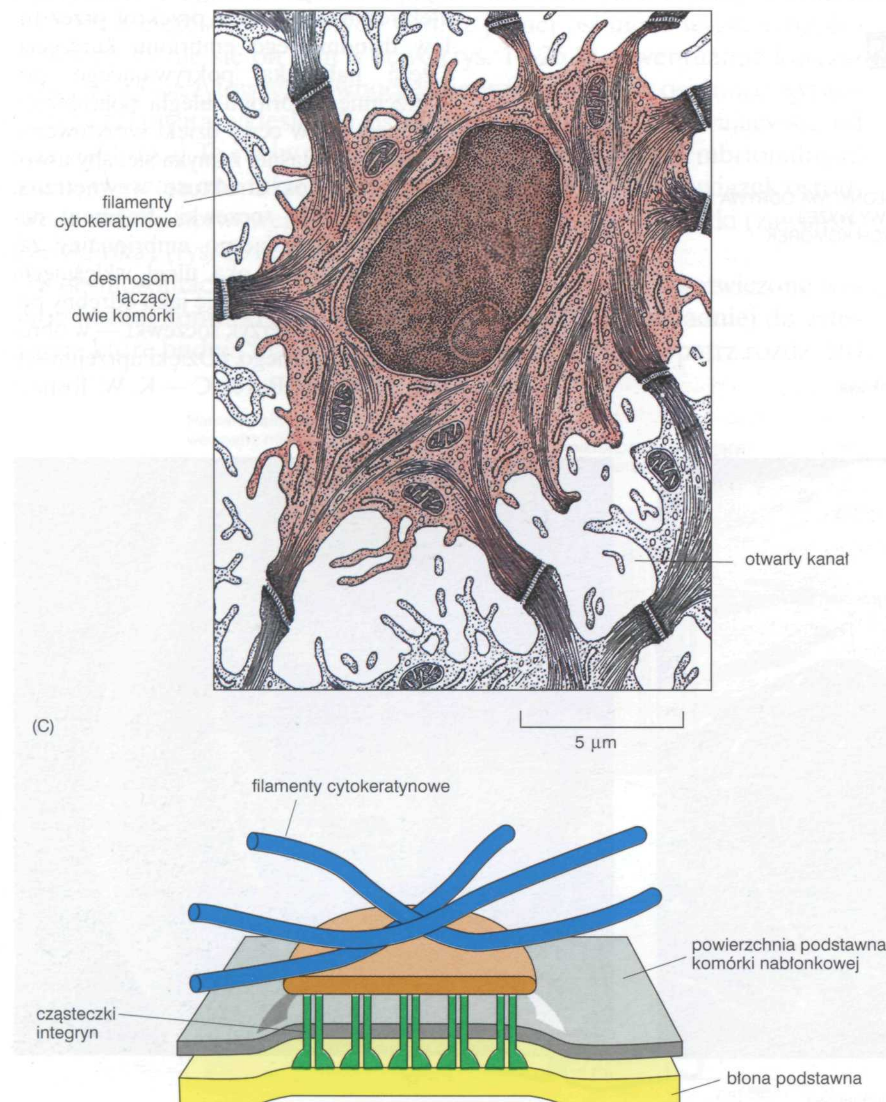




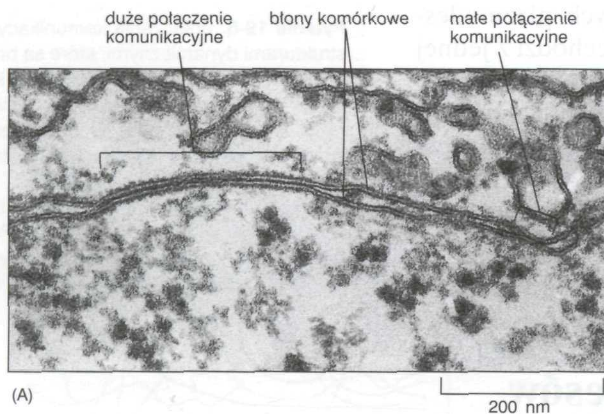
Rys. 19-25. Wciąganie warstwy nabłonkowej i formowanie cewy lub pęcherzyka. (A) Diagram pokazujący, w jaki sposób szczytowe wiązki filamentów aktynowych sąsiednich komórek, połączone za pomocą międzykomórkowych połączeń zwierających, powodują zwężanie się szczytowych części komórek. W zależności od tego, czy skurcz jest zorientowany wzdłuż jednej osi, czy zachodzi równomiernie we wszystkich kierunkach, nabłonek może się zwijać w cewę lub wpuklać się tworząc pęcherzyk. (B) Tworzenie cewy nerwowej; skaningowa mikrografia elektronowa pokazuje przekrój przez tułów dwudniowego embrionu kurczęcia. Część nabłonka pokrywającego powierzchnię embrionu uległa pogrubieniu i zwinęła się w cewę dzięki szczytowemu skurczowi i właśnie zamyka się, aby utworzyć oddzielną strukturę wewnętrzną. (C) Tworzenie soczewki; fragment nabłonka pokrywającego embrionalny zawiązek siatkówki oka uległ wklęśnięciu i ostatecznie oderwał się jako odrębny pęcherzyk — pęcherzyk soczewki — w obrębie kielicha ocznego. (Dzięki uprzejmości: B — Jaen-Paul Revel; C — K. W. Tosney)

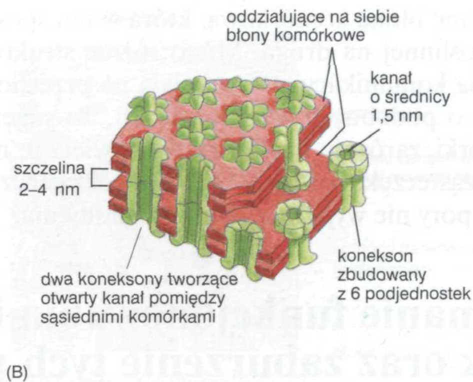


Rys. 19-26. Desmosomy. (A) Mikrografia elektronowa desmosomu, łączącego dwie komórki w nabłonku traszki, pokazująca przyłączenie włókienek cytokeratynowych. (B) Schematyczny rysunek desmosomu. Na cytoplazmatycznej powierzchni obu błon komórkowych znajduje się gęsta płytka zbudowana z różnorodnego zbioru białek wiążących, do której powierzchni wewnętrznej zakotwiczają się filamenty cytokeratynowe. Białka rodziny kadheryn zakotwiczają się w powierzchni zewnętrznej każdej płytki i przebijają błony łącząc razem dwie komórki. (C) Rysunek wykonany na podstawie mikrografii elektronowej skrawka naskórka ludzkiego, pokazujący wiązki filamentów cytokeratynowych, które przebiegają w cytoplazmie jednej z głębiej położonych komórek i wnikają do desmosomów, co łączy tę komórkę (kolor *czerwony*) do sąsiednich. Pomiędzy przylegającymi komórkami w tej głębokiej warstwie naskórka znajdują się także otwarte kanały umożliwiające swobodny przepływ substancji odżywczych przez metabolicznie aktywną tkankę. (A — z: D. E. Kelly, *J. Cell Biol*. 28: 51–59, 1966, przedrukowano za zgodą Rockefeller University Press; C — z: R. V. Krstić, Ultrastructure of the Mammalian Cell: An Atlas. Berlin: Springer, 1979)



Rys. 19-27. Półdesmosomy łączą filamenty cytokeratynowe w komórkach nabłonkowych z błoną podstawną



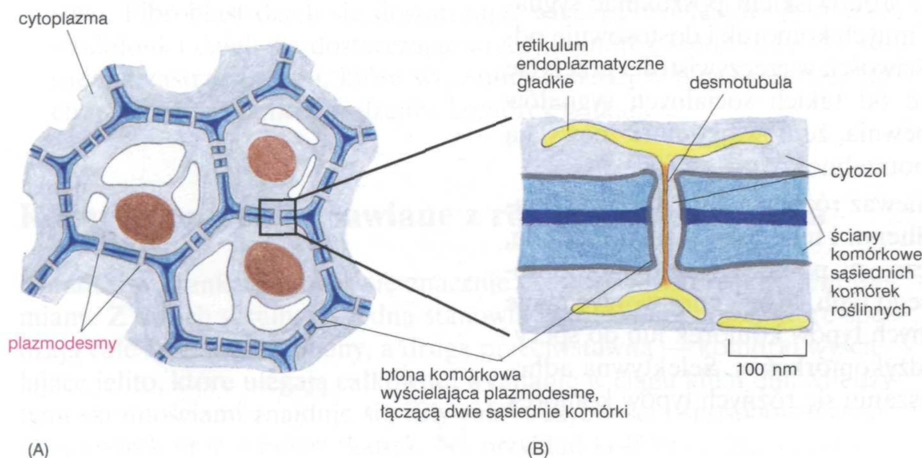


Rys. 19-28. Połączenia komunikacyjne. (A) Mikrografia elektronowa ultracienkiego skrawka pokazująca połączenie komunikacyjne między dwiema hodowanymi komórkami. (B) Model połączenia komunikacyjnego. Schemat pokazuje oddziałujące na siebie błony komórkowe dwóch sąsiednich komórek. Przez obie dwuwarstwy lipidowe (kolor *czerwony*) przechodzą zespoły białek zwanych *koneksonami* (kolor *zielony*); każdy z nich składa się z sześciu identycznych podjednostek białkowych. Dwa koneksony łączą się w poprzek szczeliny międzykomórkowej tworząc wodny kanał łączący dwie komórki. (Z: N. B. Gilula, in Cell Communication [R. P. Cox, ed.], pp. 1–29. New York: Wiley, 1974. Przedrukowano za zgodą John Wiley & Sons, Inc.)

Połączenia komunikacyjne umożliwiają przechodzenie jonom i małym cząsteczkom z komórki do komórki

Ostatni typ połączeń międzykomórkowych, znaleziony praktycznie we wszystkich nabłonkach i wielu innych typach tkanek, służy zupełnie innym celom. Jest to **połączenie komunikacyjne** (neksus, połączenie szczelinowe, ang. **gap junction**). W mikroskopie elektronowym widzimy, że fragmenty błon dwóch komórek leżą blisko siebie i dokładnie równolegle, z bardzo wąską, 2–4 nm szczeliną między nimi (rys. 19-28A). Szczelina nie jest pusta, lecz brzegi jej są połączone przez wystające domeny wielu identycznych kompleksów białkowych, które znajdują się w błonach komórkowych dwóch naprzeciw siebie leżących komórek. Kompleksy te, zwane *koneksonami*, tworzą kanały w poprzek dwóch błon komórkowych i są ustawione końcami do siebie, wytwarzając wąskie przejście pozwalające na przechodzenie jonów nieorganicznych i małych cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie (do masy cząsteczkowej ok. 1000 daltonów) z cytoplazmy jednej komórki do drugiej (rys. 19-28B). Stanowi to elektryczny i metaboliczny łącznik między komórkami. Na przykład połączenia komunikacyjne między komórkami mięśnia sercowego dostarczają elektrycznego łącznika, który umożliwia roznoszenie się fal elektrycznego pobudzenia na całą tkankę, co uruchamia skoordynowany skurcz komórek.

Co ciekawe, tkanki roślinne, mimo braku wszystkich innych opisanych wcześniej połączeń międzykomórkowych, mają czynnościowy odpowiednik połączeń komunikacyjnych. Cytoplazmy sąsiednich komórek roślinnych są połączone poprzez maleńkie kanaliki komunikacyjne, zwane *plazmodesmami*, które łączą brzegi obu ścian komórkowych (rys. 19-29).



Rys. 19-29. Plazmodesmy. (A) Cytoplazmatyczne kanały plazmodesmów przebijają ścianę komórki roślinnej i łączą razem wszystkie komórki w roślinie. (B) Każda plazmodesma jest wyścielona błoną komórkową wspólną dla obu połączonych komórek. Zwykle zawiera ona także delikatne struktury tubularne, desmotubule, wywodzące się z retikulum endoplazmatycznego gładkiego (siateczki śródplazmatycznej gładkiej). Plazmodesma pozwala zazwyczaj na przechodzenie z komórki do komórki jedynie małym cząsteczkom i jonom

W odróżnieniu od kanałów w połączeniach komunikacyjnych, plazmodesmy są wysłane błoną komórkową, która w ten sposób przechodzi z jednej komórki roślinnej na drugą. Mimo różnic strukturalnych plazmodesmy i połączenia komunikacyjne pozwalają na przechodzenie jonów i małych cząsteczek o podobnych właściwościach. To sugeruje, że sąsiadujące ze sobą komórki, zarówno u roślin, jak i u zwierząt, mają potrzebę wymiany prostych cząsteczek, natomiast ich makrocząsteczki pozostają rozdzielone. Do tej pory nie wyjaśniono tego zagadnienia.

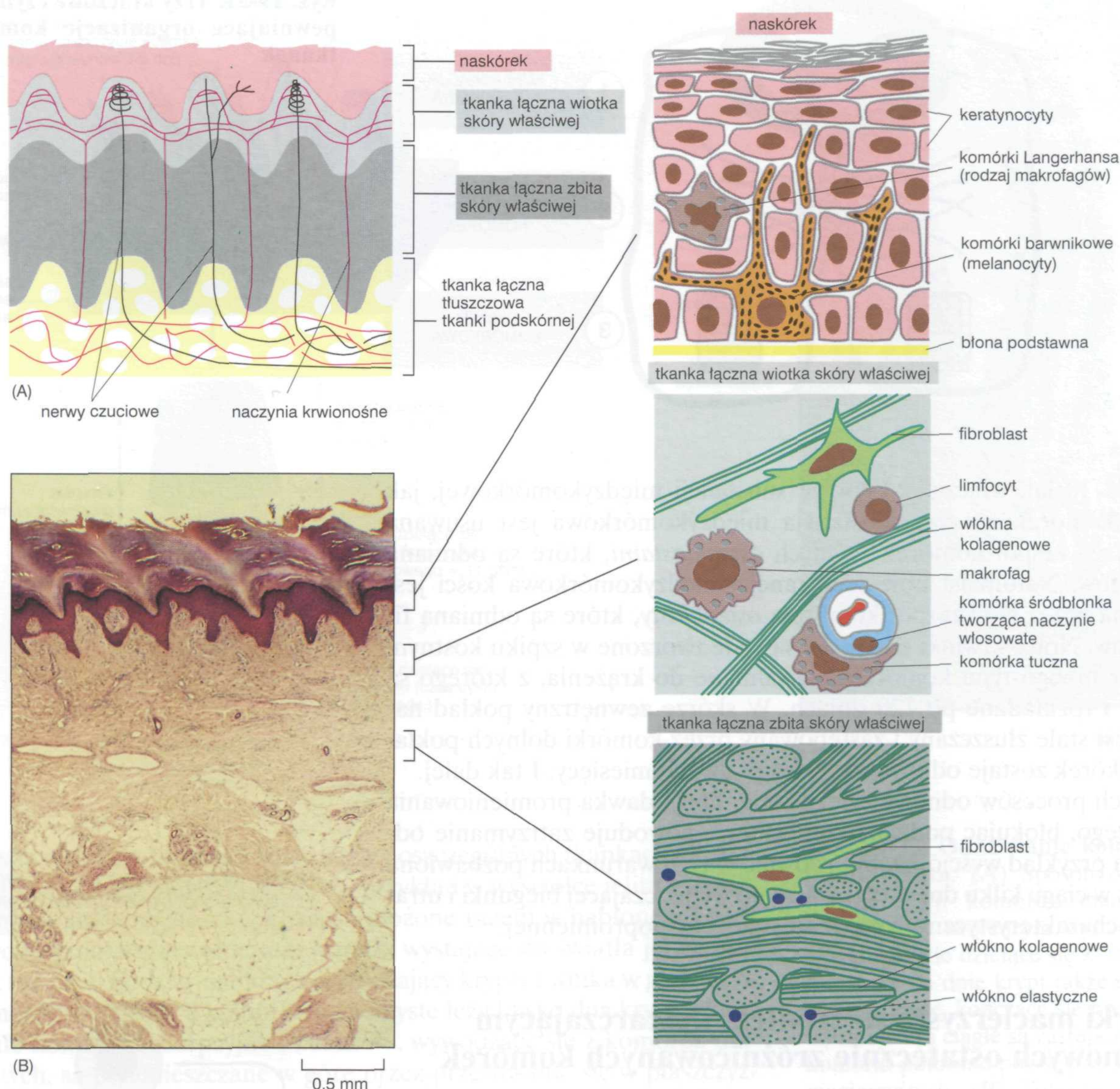
Pytanie 19-5. Połączenia komunikacyjne są strukturami dynamicznymi, które są bramkowane, podobnie jak konwencjonalne kanały. Mogą się one zamykać w wyniku odwracalnych zmian konformacji w odpowiedzi na zmiany w komórce. Na przykład, przepuszczalność połączeń komunikacyjnych spada w ciągu kilku sekund, gdy podnosi się poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+}. Pomyśl, dlaczego ten rodzaj regulacji może być ważny dla prawidłowego funkcjonowania tkanki.

Utrzymanie funkcjonowania i odnowa tkanek oraz zaburzenie tych procesów w nowotworach

Mimo że wyspecjalizowane tkanki naszego ciała różnią się pod wieloma względami, wszystkie mają pewne podstawowe wymagania, zwykle spełniane przez różnorodne typy komórek, jak zilustrowano to dla skóry na rys. 19-30. Wszystkie tkanki potrzebują mechanicznej siły, która jest często dostarczana przez podłoże podporowe lub szkielet tkanki łącznej zawierającej fibroblasty. W tej tkance łącznej naczynia krwionośne, wysłane *komórkami śródbłonka*, zaspokajają zapotrzebowanie na tlen i składniki odżywcze oraz zapewniają wywóz odpadów. W podobny sposób wiele tkanek jest unerwionych za pomocą aksonów, które są osłonięte przez *komórki Schwanna*. *Makrofagi* radzą sobie z obumarłymi komórkami i innymi niepotrzebnymi pozostałościami, a *limfocyty* i inne krwinki białe zwalczają infekcje. Większość z tych komórek pochodzi spoza tej tkanki i wnika do niej albo wcześnie podczas jej rozwoju (komórki śródbłonka, aksony komórek nerwowych i komórki Schwanna), albo stale w trakcie życia (makrofagi i inne krwinki białe). Ten złożony aparat pomocniczy jest konieczny do zapewnienia funkcjonowania podstawowych wyspecjalizowanych komórek w tkance, np. komórek kurczliwych w mięśniach, komórek wydzielniczych w gruczołach i komórek krwiotwórczych w szpiku kostnym.

Dlatego też prawie każda tkanka jest skomplikowaną kompozycją różnych typów komórek, które muszą zachować swoją indywidualność i funkcjonować w tym samym środowisku. Ponadto, w większości dojrzałych tkanek, komórki ciągle giną i są zastępowane przez nowe. Mimo całego zamieszania związanego z wymianą komórek i odnową tkanki, organizacja tkanki musi być zachowana. Trzy główne czynniki przyczyniają się do tego, aby było to możliwe (rys. 19-31).

1. *Komunikacja komórkowa*. Każdy typ wyspecjalizowanej komórki jest w nieustannym kontakcie ze swoim środowiskiem poszukując sygnałów, takich jak czynniki wzrostu, od innych komórek i dostosowuje odpowiednio własną proliferację i właściwości; w rzeczywistości przeżycie większości komórek zależy właśnie od takich socjalnych sygnałów (rozdz. 15). Komunikowanie to zapewnia, że nowe komórki powstają jedynie wtedy i tam, gdy i gdzie są potrzebne.
2. *Wybiórcze przyleganie komórek*. Ponieważ różne rodzaje komórek mają w swoich błonach różne typy kadheryn i inne cząsteczki adhezyjne, zazwyczaj przyczepiają się wybiórczo, za pomocą wiązań homofilowych, do innych komórek tego samego typu. Mogą one tworzyć także wybiórcze przyłączenia do wielu innych typów komórek lub do specyficznych składników substancji międzykomórkowej. Selektywna adhezja zapobiega chaotycznemu wymieszaniu się różnych typów komórek w tkance.

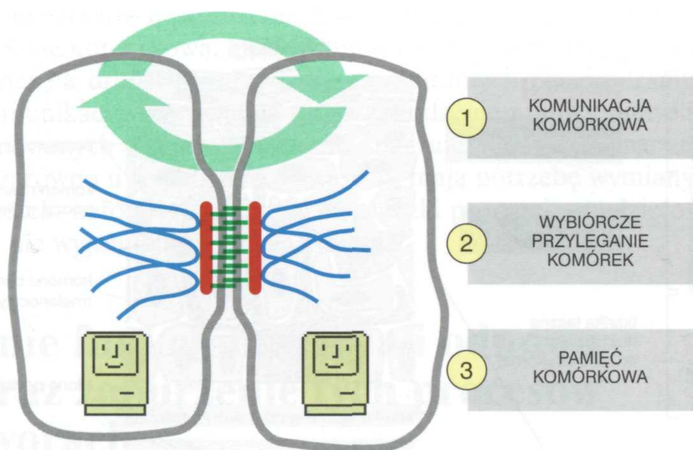


Rys. 19-30. Skóra ssaków. (A) Schematyczny rysunek pokazujący komórkową architekturę grubej skóry. (B) Fotografia preparatu przekroju przez podeszwę stopy ludzkiej, barwionego hematoksyliną i eozyną. Skóra może być uważana za duży narząd składający się z dwóch głównych tkanek: tkanki nabłonkowej (*naskórek*) leżącej na zewnątrz oraz tkanki łącznej zbudowanej z mocnej skóry właściwej (z której jest wyprawiona skóra garbowana) i niżej położonej *tkanki podskórnej* bogatej w komórki tłuszczowe. Każda tkanka składa się z różnych typów komórek. Skóra właściwa i tkanka podskórna są bogato zaopatrzone w naczynia krwionośne i nerwy. Niektóre włókna nerwowe wnikają także do naskórka

3. *Pamięć komórkowa*. Jak widzieliśmy w rozdz. 8, wyspecjalizowany sposób ekspresji genów, wywołany przez sygnały działające podczas rozwoju embrionalnego, zostaje potem trwale zachowany, tak że komórka zachowuje swój wyróżniający ją charakter i przenosi go na potomstwo. Fibroblast dzieli się dostarczając więcej fibroblastów, komórka śródbłonka dzieli się dostarczając więcej komórek śródbłonka. Ta zasada, z zastrzeżeniami, które wyjaśnimy później w tym rozdziale, zachowuje różnorodność rodzajów komórek w tkance.

Różne tkanki są odnawiane z różną częstotliwością

Komórki w tkankach różnią się znacznie częstotliwością i sposobem wymiany. Z dwóch skrajności jedną stanowią komórki nerwowe, które spędzają całe życie bez wymiany, a drugą przeciwstawną — komórki wyścielające jelito, które ulegają całkowitej wymianie w ciągu kilku dni. Między tymi skrajnościami znajduje się cały zakres szybkości i sposobów wymiany komórek oraz odnowy tkanek. Na przykład kość ma u ludzi czas wy-



Rys. 19-31. Trzy kluczowe czynniki zapewniające organizację komórkową tkanek

miany ok. 10 lat, włączając odnowę substancji międzykomórkowej, jak również komórek; starsza substancja międzykomórkowa jest usuwana wolno przez zespół komórek zwanych *osteoklastami*, które są odmianą makrofagów. Natomiast nowa substancja międzykomórkowa kości jest odkładana przez inny zespół komórek, *osteoblasty*, które są odmianą fibroblastów. Nowe krwinki czerwone są stale tworzone w szpiku kostnym (z jeszcze innego typu komórek) i uwalniane do krążenia, z którego są usuwane i rozkładane po 120 dniach. W skórze zewnętrzny pokład naskórka jest stale złuszczany i zastępowany przez komórki dolnych pokładów, naskórek zostaje odnowiony w ciągu dwóch miesięcy. I tak dalej.

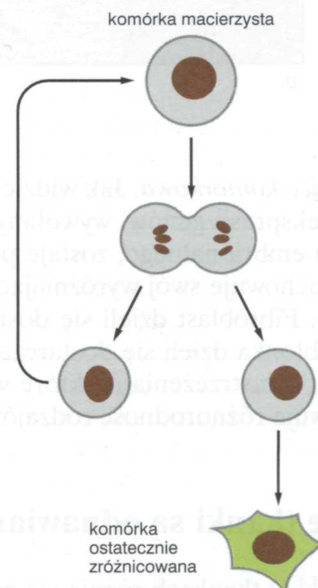
Od tych procesów odnowy zależy życie. Duża dawka promieniowania jonizującego, blokując podziały komórkowe, powoduje zatrzymanie odnowy. Na przykład wyściółka jelita zostaje w tych warunkach pozbawiona komórek w ciągu kilku dni, co prowadzi do wyniszczającej biegunki i utraty wody, charakterystycznych dla ostrej choroby popromiennej.

Pytanie 19-6. Dlaczego promieniowanie jonizujące hamuje podziały komórkowe?

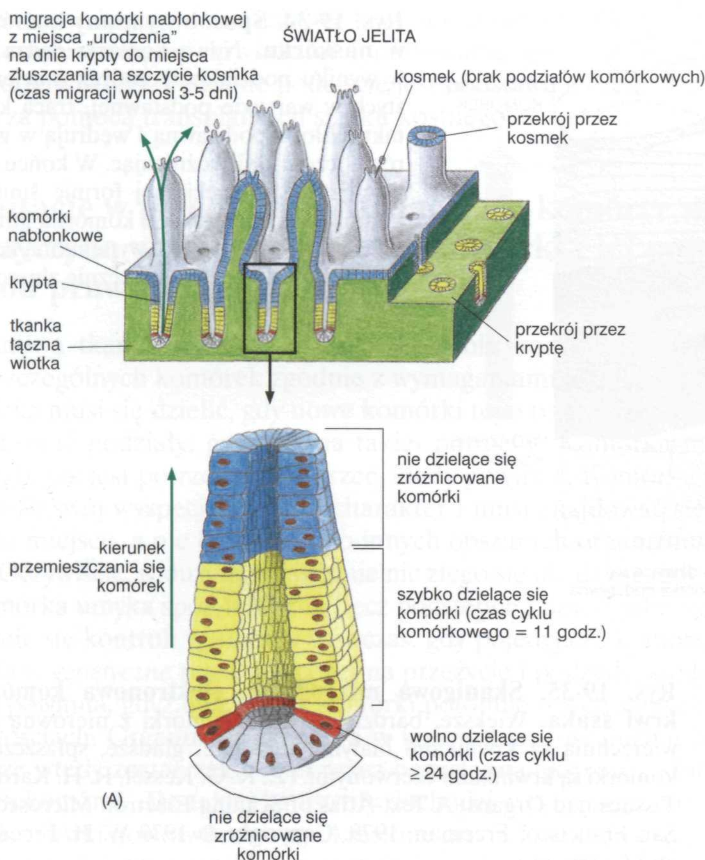
Komórki macierzyste są źródłem dostarczającym ciągle nowych ostatecznie zróżnicowanych komórek

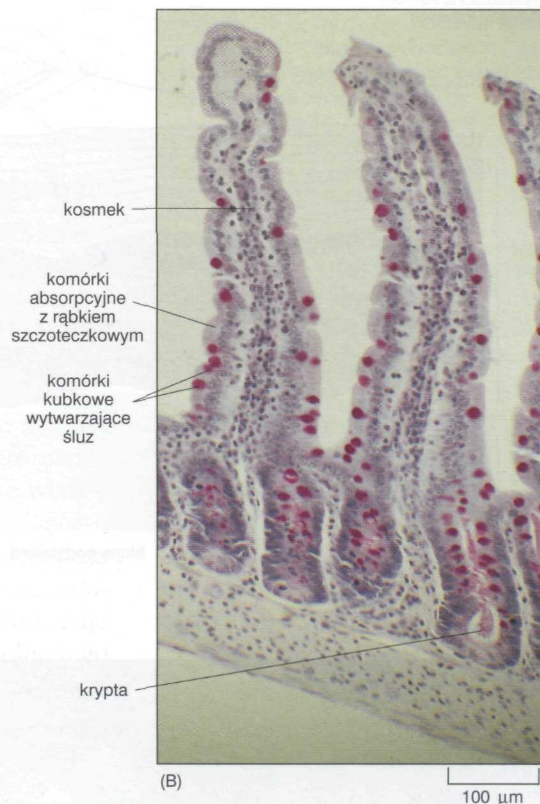
Wiele zróżnicowanych komórek, wymagających ciągłego zastępowania, jest niezdolnych do podziałów. Komórkami tego rodzaju są krwinki czerwone, powierzchowne komórki naskórka oraz komórki absorpcyjne i kubkowe wyściółki jelita. Stwierdzenie *ostatecznie zróżnicowane* znaczy, że komórki znajdują się na końcowym etapie swojej drogi rozwojowej.

Większość takich komórek powstaje z zapasowych komórek prekursorowych, zwanych **komórkami macierzystymi**, które znajdują się w odpowiednich tkankach razem z komórkami zróżnicowanymi. Komórki macierzyste nie są ostatecznie zróżnicowane i mogą się dzielić bez końca (lub co najmniej do końca życia zwierzęcia). Gdy komórka macierzysta się dzieli, każda komórka potomna ma jednak wybór: albo może pozostać komórką macierzystą, albo może się włączyć w nieodwracalny proces prowadzący do ostatecznego zróżnicowania (rys. 19-32). Zadaniem komórek macierzystych zatem nie jest pełnienie specjalistycznych funkcji komórek zróżnicowanych, lecz wytwarzanie komórek, które będą te specjalistyczne funkcje pełniły. W rezultacie komórki macierzyste mają często nieokreślony wygląd, co powoduje trudności w ich identyfikacji. Chociaż komórki macierzyste nie są ostatecznie zróżnicowane, to są jednak *zdeterminowane*: wykazują one trwale ekspresję białek zespołu genów regulatorowych zapewniających, że ich zróżnicowane potomstwo będzie odpowiedniego typu.



Rys. 19-32. Komórka macierzysta. Gdy komórka macierzysta się dzieli, każda komórka potomna może pozostać komórką macierzystą lub stać się ostatecznie zróżnicowana





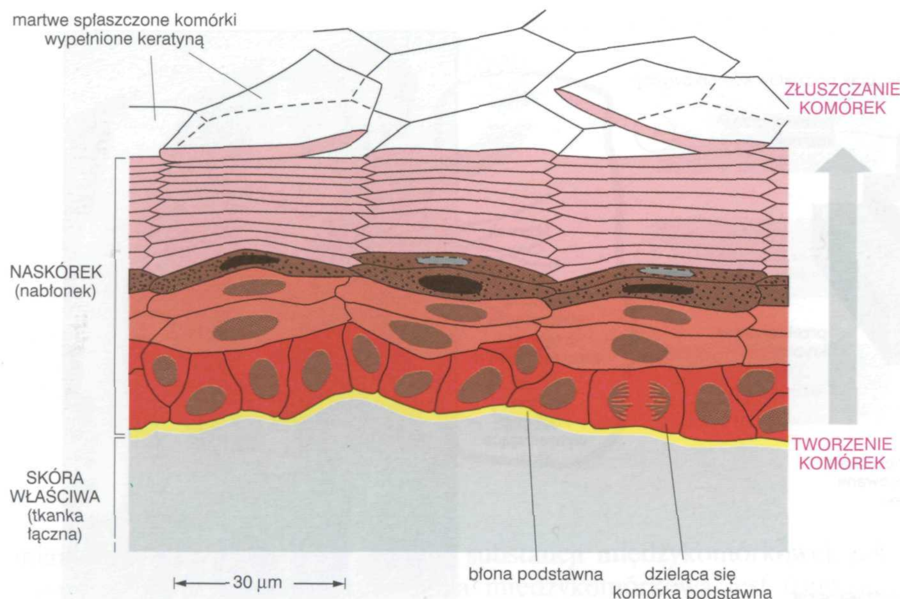
Rys. 19-33. Odnawianie komórek wyściółki jelita. (A) Sposób odnawiania i proliferacji komórek macierzystych w nabłonku tworzącym wyściółkę jelita cienkiego. Nie dzielące się komórki zróżnicowane na dnie krypt także mają ograniczone życie, kończące się programowaną śmiercią i ciągle są zastępowane przez komórki potomne powstające z komórek macierzystych. (B) Fotografia skrawka części wyściółki jelita cienkiego pokazująca kosmki i krypty. Zauważ, jak wytwarzające śluz komórki kubkowe (zabarwione *na czerwono*) są rozmieszczone w nabłonku kosmka pomiędzy komórkami absorpcyjnymi z rąbkiem szczoteczkowym

Sposób wymiany komórek różni się w poszczególnych tkankach bazujących na komórkach macierzystych. Na przykład w wyściółce jelita cienkiego komórki absorpcyjne i kubkowe są ułożone razem w nabłonek jednowarstwowy pokrywający palczaste *kosmki* wystające do światła jelita. Nabłonek ten przechodzi w nabłonek pokrywający krypty i wnika w głąb tkanki łącznej podścieliska, a komórki macierzyste leżą blisko dna krypt. Nowo powstałe komórki absorpcyjne i kubkowe, wywodzące się z komórek macierzystych, są przemieszczane w górę przez przesuwanie się w płaszczyźnie nabłonka, aż do osiągnięcia powierzchni wolnej kosmka, na którego szczycie umierające komórki są złuszczane do światła jelita (rys. 19-33).

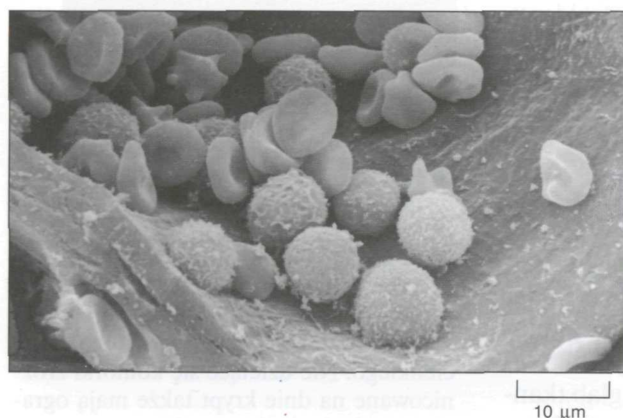
Zupełnie inny przykład znajdujemy w naskórku. Naskórek jest nabłonkiem wielowarstwowym z komórkami macierzystymi w warstwie podstawnej, przylegającej do błony podstawnej; różnicujące się komórki przemieszczają się na zewnątrz z miejsca powstania, prostopadle do powierzchni naskórka (rys. 19-34).

Pojedyncze typy komórek macierzystych wytwarzają często kilka typów zróżnicowanego potomstwa. Dobrym przykładem są komórki macierzyste w jelicie, wytwarzające komórki absorpcyjne, komórki kubkowe i kilka innych typów komórek. Proces tworzenia krwinek czerwonych, czyli *hemopoeza*, dostarcza skrajnego przykładu tego zjawiska. Wszystkie typy komórek krwi — zarówno krwinki czerwone przenoszące tlen, jak i wiele typów krwinek białych zwalczających infekcje (rys. 19-35) — bez wyjątku wywodzą się z dzielącej się *komórki macierzystej hemopoetycznej*, która zwykle znajduje się w szpiku kostnym (rys. 19-36).

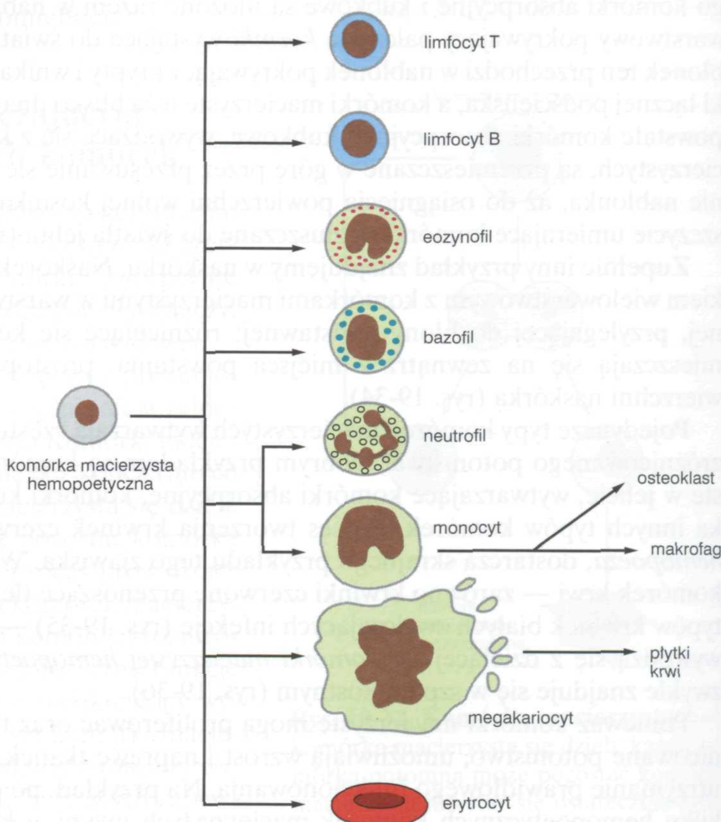
Ponieważ komórki macierzyste mogą proliferować oraz tworzyć zróżnicowane potomstwo, umożliwiają wzrost i naprawę tkanek, jak również utrzymanie prawidłowego funkcjonowania. Na przykład, po przetoczeniu kilku hemopoetycznych komórek macierzystych myszy, u której zostały



Rys. 19-34. Sposób wymiany komórek w naskórku. Nowe komórki rodzą się w wyniku podziałów komórek macierzystych w warstwie podstawnej, tracą kontakt z błoną podstawną i wędrują w górę równocześnie się różnicując. W końcu komórki ulegają specjalnej formie śmierci komórki; jądro zanika, a komórka kurczy się tworząc płaską łuskę wypełnioną keratyną. Łuska zostanie ostatecznie złuszczona z powierzchni ciała



Rys. 19-35. Skanigowa mikrografia elektronowa komórek krwi ssaka. Większe, bardziej okrągłe komórki z nierówną powierzchnią są krwinkami białymi; mniejsze, gładsze, spłaszczone komórki są krwinkami czerwonymi. (Z: R. G. Kessel, R. H. Kardon, Tissues nad Organs: A Text-Atlas of Scaning Electron Microscopy. San Francisco: Freeman, 1979. Copyright © 1979 W. H. Freeman and Company)



Rys. 19-36. Komórka macierzysta hemopoetyczna i komórki potomne. Komórka macierzysta hemopoetyczna w warunkach prawidłowych dzieli się rzadko, wytwarzając bardziej wyspecjalizowane komórki, które dzielą się dalej, dostarczając dojrzałych typów krwinek znajdowanych w krążeniu. Makrofagi obserwowane w wielu tkankach ciała i osteoklasty niszczące macierz kostną rozwijają się z tego samego źródła, podobnie jak kilka innych typów komórek nie pokazanych na tym schemacie

zniszczone komórki macierzyste krwi, jest możliwa całkowita repopulacja zwierzęcia nowymi krwinkami i uratowanie go od śmierci z powodu niedokrwistości. Podobne podejście jest podstawą leczenia białaczki u ludzi za pomocą transplantacji szpiku kostnego.

Pytanie 19-7. Jak przypuszczasz, dlaczego komórki nabłonkowe wyściełające jelito są często odnawiane, natomiast neurony starczają na całe życie?

Mutacje w pojedynczej dzielącej się komórce mogą być przyczyną wymknięcia się tej komórki i jej potomstwa spod prawidłowej kontroli

Odnowa tkanek wymaga złożonej kontroli, koordynującej zachowanie poszczególnych komórek zgodnie z wymaganiami całego organizmu. Komórka musi się dzielić, gdy nowe komórki tego typu są potrzebne, lub zahamować podziały, gdy nie ma takiej potrzeby. Komórka musi żyć tak długo, jak jest potrzebna, i umrzeć, kiedy powinna. Komórka musi utrzymywać swój wyspecjalizowany charakter i musi znajdować się we właściwym miejscu, a nie błąkać się po innych obszarach organizmu.

Oczywiście, w dużym organizmie nic złego się nie dzieje, gdy pojedyncza komórka umyka spod kontroli. Lecz podstępne i potencjalnie groźne załamanie się kontroli występuje wówczas, gdy pojedyncza komórka wykazuje *zmiany genetyczne* pozwalające jej na przeżycie i podziały, kiedy robić tego nie powinna, gdyż daje wtedy komórki potomne o tych samych nieprawidłowościach. Organizacja tkanki, a w końcu także organizmu jako całości, może wtedy zostać zakłócona przez bezustanną ekspansję klonu zmienionych komórek. Do takiej katastrofy dochodzi w przypadku **nowotworu**.

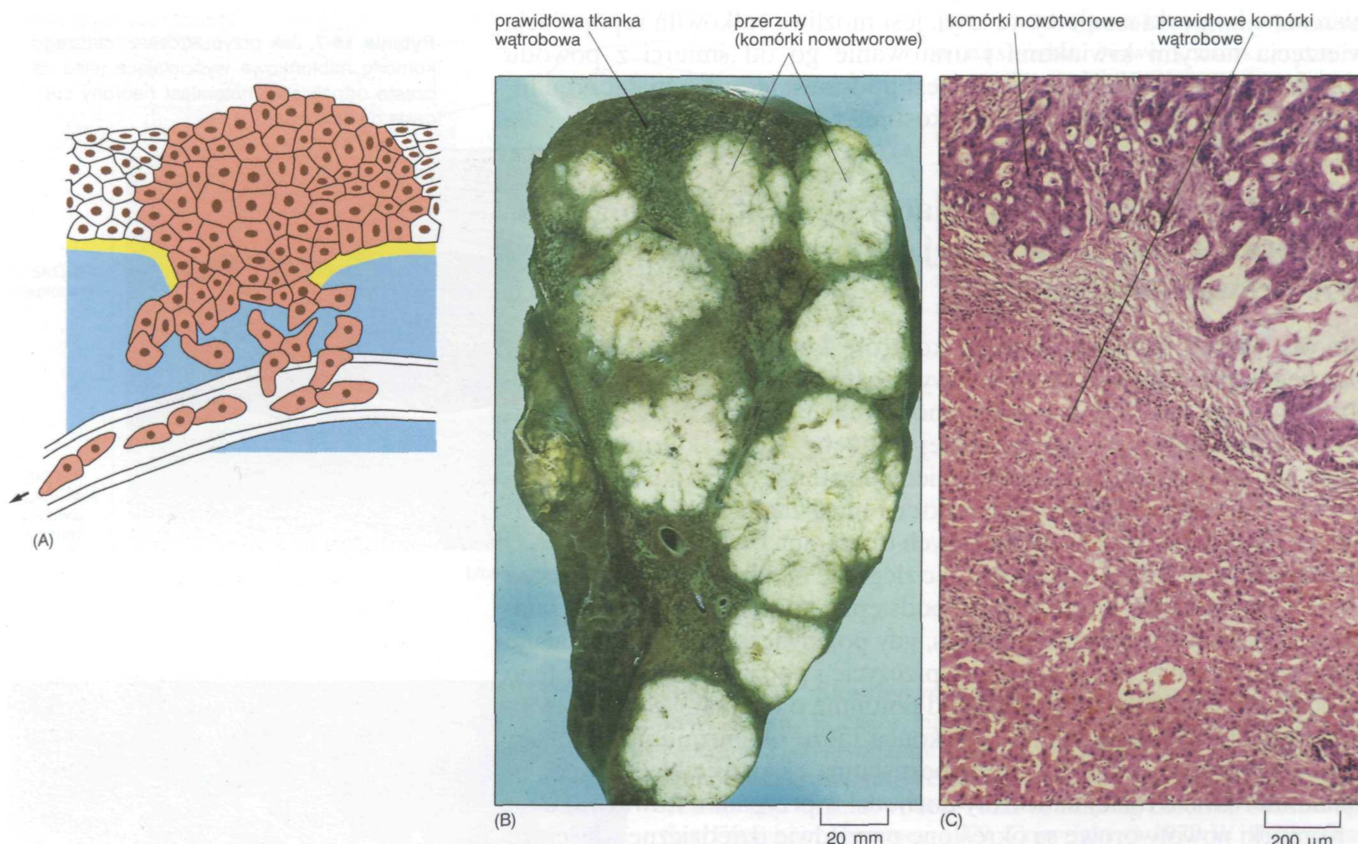
Komórki nowotworowe są określone przez dwie dziedziczne właściwości: one i ich potomstwo 1) namnażają się bez ograniczenia oraz 2) wnikają i kolonizują okolice zarezerwowane normalnie dla innych komórek. Do szczególnego niebezpieczeństwa dochodzi wtedy, gdy mamy do czynienia z połączeniem obu cech. Komórki, które wykazują tylko pierwszą właściwość, a nie mają drugiej, czyli nadmiernie proliferują, lecz pozostają skupione razem w jednej masie, tworzą *guz* (*tumor*), nazywany *guzem łagodnym*, gdyż zwykle można go łatwo i całkowicie usunąć chirurgicznie. Guz staje się naprawdę nowotworowy tylko wtedy, gdy ma zdolność do naciekania okolicznych tkanek i w takim przypadku mówimy, że jest to *guz złośliwy*.

Komórki nowotworowe złośliwe z cechami inwazyjnymi mogą oderwać się od guza pierwotnego, przedostać się do naczyń krwionośnych lub limfatycznych i tworzyć guzy wtórne, czyli *przerzuty*, w innych częściach ciała (rys. 19-37). Im bardziej szeroki jest zasięg guza, tym staje się on trudniejszy do wyeliminowania.

Nowotwór jest konsekwencją mutacji i naturalnej selekcji w obrębie populacji komórek tworzących organizm

Nowotwór jest chorobą genetyczną — konsekwencją zmian patologicznych w informacji zapisanej w DNA. Nowotwory różnią się od innych chorób genetycznych tym, że mutacje leżące u podstaw nowotworów są zasadniczo *mutacjami komórek somatycznych*, które występują w rozproszonych pojedynczych komórkach dojrzałego organizmu, w odróżnieniu od *mutacji komórek rozrodczych*, przekazywanych za pomocą komórek rozrodczych, z których rozwija się cały wielokomórkowy organizm.

Niektóre przykłady z wielu różnorodnych rodzajów mutacji związanych z nowotworami przedstawiono wcześniej w tej książce (s. 302–303,



Rys. 19-37. Przerzut nowotworowy. (A) Aby wytworzyć kolonię komórek w nowym miejscu, czyli przerzut, komórki guza pierwotnego muszą przekroczyć błonę podstawną, migrować przez tkankę łączną i przejść do krwiobiegu. (B) Przerzuty w ludzkiej wątrobie pochodzące z guza pierwotnego w okrężnicy. Przerzuty są jasno zabarwionymi masami komórek. (C) Duże powiększenie, barwienie w celu pokazania różnicy między komórkami prawidłowymi i nowotworowymi. (B i C dzięki uprzejmości: Peter Isaacson)

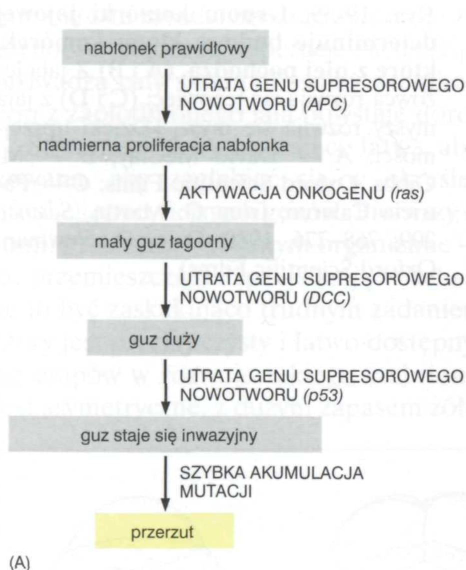
511 i 590–593). Dominujące mutacje nasilające funkcję mogą tworzyć **onkogeny**, promujące rozwój nowotworów; na przykład mutacja może prowadzić do tworzenia wadliwego receptora dla czynnika wzrostu, w wyniku czego komórka i jej potomstwo postępują jakby otrzymywały sygnał do podziałów, mimo że go nie otrzymują. Odwrotnie, recesywne mutacje wykluczające funkcję mogą usuwać lub inaktywować **geny supresorowe nowotworów**, których prawidłowe produkty są konieczne do utrzymania kontroli proliferacji komórkowej i inwazyjności.

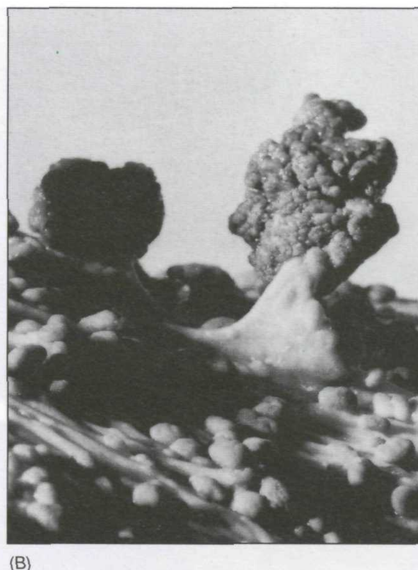
Najistotniejsze jest, że w obu przypadkach mutacje nie upośledzają zmienionej komórki. Przeciwnie, mutacje dają tym komórkom konkurencyjną przewagę nad prawidłowymi komórkami sąsiednimi. To prowadzi do katastrofy całego organizmu wielokomórkowego. W nowotworach mutacje i selekcja naturalna walczą w obrębie populacji komórkowych tworzących organizm i dezorganizują jego prawidłową budowę.

Nowotwór wymaga nagromadzenia się mutacji

Jak widzieliśmy w rozdz. 6, mutacje są nieuniknione. Nawet w środowisku wolnym od dymu tytoniowego, promieniowania i innych zewnętrznych niepokojących nas mutagenów mutacje pojawiają się spontanicznie z przybliżoną częstością ok. 10^{-6} mutacji na gen na podział komórki — wartość ustalona na podstawie zasadniczych ograniczeń w dokładności replikacji DNA i jego naprawy. U człowieka podczas jego życia zachodzi mniej więcej 10^{16} podziałów komórkowych; tak więc każdy pojedynczy gen w genomie każdego człowieka ma prawdopodobieństwo ok. 10^{10} pojedynczych możliwości, aby ulec mutacji. Z tego punktu widzenia nie jest problemem, dlaczego nowotwór powstaje, ale dlaczego pojawia się tak rzadko.

Pytanie 19-8. Podczas całego życia zachodzi w organizmie ludzkim ok. 10^{16} podziałów komórkowych, mimo to ciało dorosłego człowieka składa się tylko z 10^{12} komórek. Dlaczego te dwie liczby są tak różne?







Rys. 19-38. Wzrost nowotworu w wyniku zakumulowania mutacji. (A) Kolejność mutacji leżąca u podstaw wielu przypadków raka jelita grubego (raka okrężnicy i odbytnicy). Kolejność zdarzeń tu pokazana zachodzi w okresie 10 do 20 lat lub dłużej. Zaczyna się od utraty genu supresorowego nowotworów *APC* (*adenomatous polyposis coli*), pierwotnie rozpoznanego dzięki badaniom rzadkich przypadków u ludzi z wrodzoną predyspozycją do raka okrężnicy i odbytnicy. Utrata tego genu daje początek choroby w młodym wieku i w wielu niezależnych miejscach jelita grubego. Ludzie ci rodzą się z jedną tylko kopią genu, tak więc wystarcza jedna mutacja do całkowitego zniesienia funkcji genu, zamiast dwóch mutacji somatycznych potrzebnych do uzyskania takiej sytuacji u osoby z prawidłowym genomem. Utrata *APC* inicjuje wzrost guza łagodnego, zwanego polipem, który może dać początek guzowi złośliwemu w wyniku dalszych mutacji. (B) U pacjenta z wrodzoną mutacją *APC* są widoczne tysiące polipów w błonie śluzowej okrężnicy (u osoby z prawidłowym genomem spotyka się jeden do dwóch polipów). W wyniku dalszych mutacji niektóre z tych polipów będą wzrastać i staną się nowotworami złośliwymi, jeżeli tkanki tej nie usunie się chirurgicznie. (C) Przekrój przez taki polip; zauważ zwiększoną liczbę głębokich pofałdowań nabłonka. (Dzięki uprzejmości: B — John Northover and the Imperial Cancer Research Fund; C — Anne Campbell)

Wytłumaczeniem popartym obecnie przez liczne dowody jest założenie, że komórkę prawidłową w komórkę nowotworową zmienia więcej niż jedna mutacja. Najczęściej musi zajść w jednej komórce co najmniej pięć lub sześć niezależnych mutacji, aby wystąpiły w niej wszystkie konieczne zmiany. Na przykład komórka macierzysta nabłonka w naskórku lub nabłonku jelita musi ulec zmianom, które nie tylko umożliwią jej częstsze podziały, lecz także pozwolą jej potomstwu uniknąć normalnie zachodzącego złuszczenia z zewnętrznej powierzchni nabłonka. Umożliwi im to wyparcie prawidłowych komórek sąsiednich i pozwoli pozyskać unaczynienie wystarczające do ciągłego odżywiania rosnącego guza. Aby guz stał się inwazyjny, są konieczne następne zmiany umożliwiające komórce wytworzenie sobie drogi przez błonę podstawną nabłonka do tkanki podścieliska oraz do zasiedlenia i przeżycia w nowym miejscu (rys. 19-38).

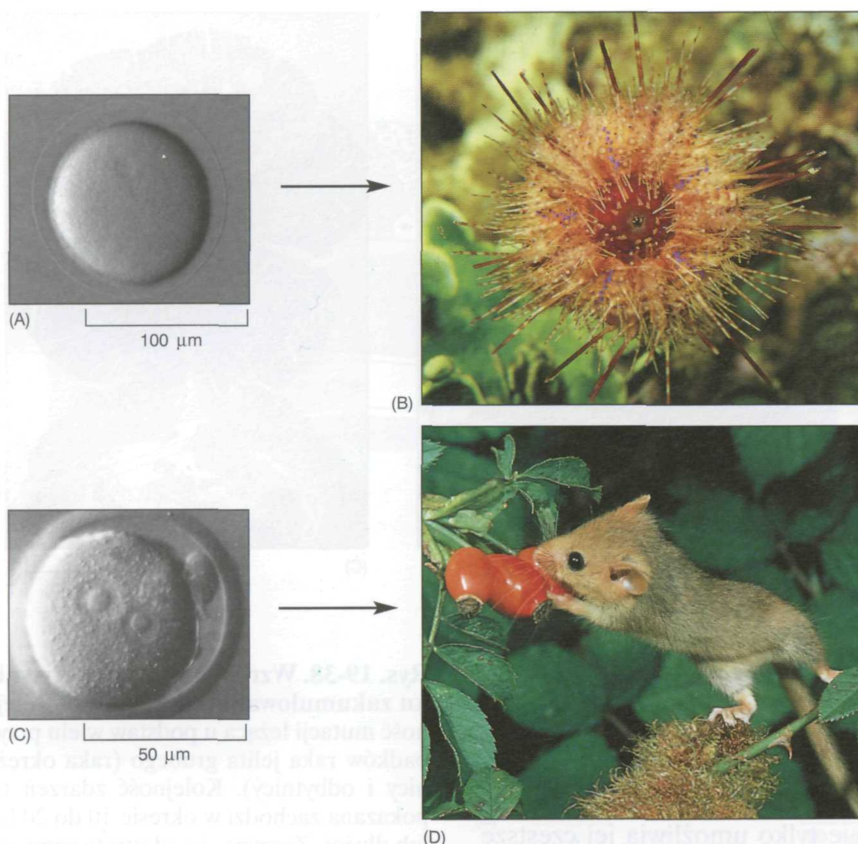
Mutacje wywołujące wzrost nowotworowy nie zachodzą w tym samym czasie, lecz stopniowo, zwykle przez wiele lat. W miarę gdy początkowa populacja komórek zmutowanych wzrasta, ulega ona powolnym zmianom; w tych komórkach zdarzą się nowe przypadkowe mutacje i niektóre z nich będą faworyzowane w drodze naturalnej selekcji.

W końcu pojawiają się komórki, które mają wszystkie nieprawidłowości charakteryzujące w pełni rozwinięty nowotwór.

Nowotwór jest typową chorobą wieku starszego, ponieważ potrzeba dużo czasu, aby w pojedynczej linii komórek nagromadziła się duża liczba mutacji somatycznych. Czasami spotyka się osobników, którzy mają wrodzone mutacje komórek rozrodczych dotyczące genów supresorowych lub onkogenów; dla tych ludzi liczba dodatkowych mutacji potrzebna do rozwoju nowotworu jest mniejsza, a choroba pojawia się z większą częstotliwością i przeciętnie w młodszym wieku. Dlatego rodziny przenoszące takie mutacje są niezwykle podatne na nowotwory.

Rozwój

Rozwój embrionalny jest przeciwieństwem nowotworu. Nowotwór zakłóca uporządkowaną strukturę ciała; rozwój ją tworzy. W nowotworze komórki zachowują się nieprawidłowo w wyniku przypadkowych mutacji w sekwen-



Rys. 19-39. Genom komórki jajowej determinuje budowę klonu komórek, które z niej pochodzą. (A i B) Z jaja jeżowca rozwija się jeżowiec; (C i D) z jaja myszy rozwija się mysz. (Dzięki uprzejmości: A — David McClay; B — M. Gibbs, Oxford Scientific Films; C — Patricia Calarco, from G. Martin, *Science* 209: 768–776, 1980; D — O. Newman, Oxford Scientific Films)

cji DNA. W rozwoju sekwencja DNA pozostaje nie zmieniona, a komórki zmieniają swoje zachowanie dzięki kontrolowanym modyfikacjom w układzie ekspresji genów. Podstawowe cechy nowotworu, dawno temu stwierdzone, wydają się oczywiste; rozwój natomiast, mimo że obecnie zaczynamy go rozumieć, pozostaje nadal głęboko zadziwiającym procesem.

Rozwój rozpoczyna się od pojedynczej komórki — zapłodnionej komórki jajowej. Dzieli się ona wielokrotnie dając klon komórek, liczący więcej niż 1000000000000 u istoty ludzkiej. Wszystkie komórki zawierają ten sam genom, ale są wyspecjalizowane w różnych kierunkach. Klon taki ma swoją określoną budowę, może mieć kształt stokrotki lub dębu, jeżowca, wieloryba lub myszy (rys. 19-39).

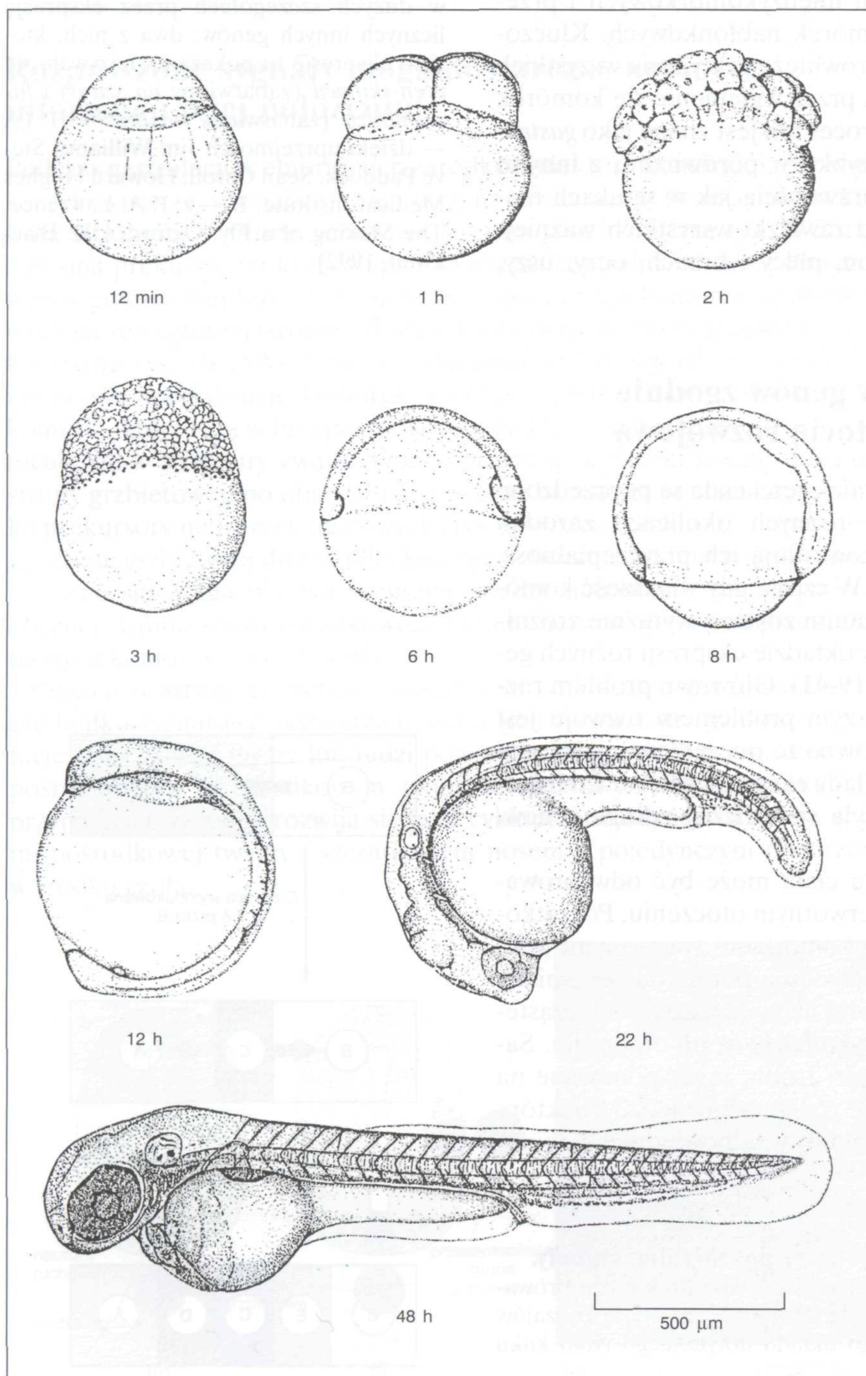
Budowa jest zdeterminowana przez genom zawarty w komórce jajowej. Liniowa sekwencja nukleotydów A, G, C i T w DNA kieruje wytwarzaniem wielu różnych typów komórek, które wykazują ekspresję różnego zestawu genów i są ułożone w dokładny, skomplikowany, przestrzenny wzór. Wytłumaczenie, jak to się dzieje, jest trudne.

Zaprogramowane przemieszczanie komórek umożliwia planową budowę ciała zwierząt

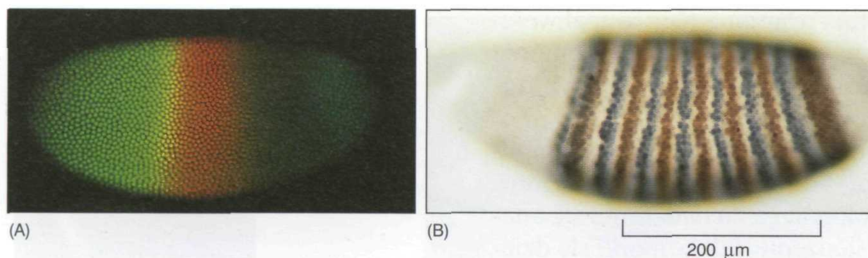
Mimo że ostateczna budowa ciała zwierząt może być niezmiernie złożona, jest ona wytworem ograniczonego zakresu czynności komórki. Jak widzieliśmy w poprzednim rozdziale, komórki rosną, dzielą się i umierają; tworzą połączenia mechaniczne i wzbudzają siły do przemieszczania komórek; różnicują się przez włączanie lub wyłączanie wytwarzania specyficznych zespołów białek; wytwarzają sygnały molekularne wpływając na sąsiednie komórki i odpowiadają na sygnały wysyłane do nich przez sąsiednie komórki. Genom, identyczny w każdej komórce danego organiz-

mu, określa zasady, zgodnie z którymi zostają włączane różne możliwości czynności komórek. Operacje zachodzące w każdej pojedynczej komórce prowadzą cały skomplikowany wielokomórkowy proces rozwoju, w którym z zapłodnionego jaja powstaje dorosły organizm.

Strategia jest wystarczająco łatwa, aby ją streścić, ale bardziej skomplikowana, aby zagłębiać się w określenia konkretnych mechanizmów i funkcji specyficznych genów. Pierwszy krok polega na nauczeniu się anatomii procesu w wybranym organizmie – śledzenie, jak komórki się dzielą, przemieszczają i specjalizują w celu wytworzenia struktury ciała. Może to być zaskakująco trudnym zadaniem, nawet w przypadku embrionu, który jest przeźroczysty i łatwo dostępny. Na rysunku 19-40 pokazano serię etapów w rozwoju takiego embrionu — ryby danio pręgowany. Jajo jest asymetryczne, z dużym zapasem żółtka w jego dolnej części i jasną cy-



Rys. 19-40. Etapy rozwoju zarodka ryby danio pręgowany. Dzięki złożonym ruchom komórkowym i różnicowaniu komórkowemu zapłodnione jajo zamienia się w rozpoznawalną rybkę w ciągu 48 godzin. (Zaadaptowano z: C. B. Kimmel et al., *Developmental Dynamics* 203: 256–310, 1995)



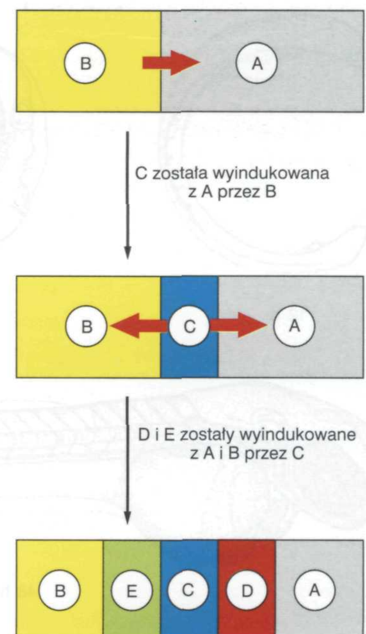
Rys. 19-41. Wzory ekspresji genów we wczesnym zarodku *Drosophila*. Komórki nie zaczęły się jeszcze jawnie różnicować, a już wykazują ekspresję różnych genów regulatorowych zgodnie z ich umiejscowieniem w zarodku. (A) 2,5 godziny po zapłodnieniu, układy ekspresji genów wyróżniają wyraźne regiony ciała; znakowane fluorescencyjnie przeciwciała użyto tutaj do pokazania ekspresji dwóch genów, *hunchback* (kolor *zielony*) i *Krüppel* (kolor *czerwony*), kodowanych przez geny białek regulatorowych. (B) 3,5 godziny po zapłodnieniu, przyszły powtarzający się wzór segmentów ciała został poprzedzony w dużych szczegółach przez ekspresję licznych innych genów; dwa z nich, których ekspresję tu pokazano, nazywają się *even-skipped* (zabarwiony *na szaro*) i *fushi-tarazu* (zabarwiony *na brązowo*). (A — dzięki uprzejmości: Jim Williams, Steve Paddock, Sean Caroll, Howard Hughes Medical Institute; B — z: P. A. Lawrence, The Making of a Fly. Oxford, UK: Blackwell, 1992)

toplazmą z jądrem w górnej części. Zapłodnienie uruchamia *bruzdkowanie*, czyli podział tej komórki na wiele mniejszych, które potem wykonują złożoną serię ruchów. Gdy niektóre komórki przemieszczają się osobno, inne łączą się razem za pomocą połączeń międzykomórkowych i przemieszczają się wspólnie jako warstwa komórek nabłonkowych. Kluczowym wczesnym etapem w rozwoju ryb, jak również praktycznie wszystkich gatunków zwierząt, jest wytworzenie jelita przez wgłębienie się komórek zewnętrznych embrionu do wewnątrz — proces ten jest znany jako *gastrulacja*. Gastrulacja zachodzi spokojnie i szybko w porównaniu z innymi przemianami rozwojowymi; z cudowną sprawnością jak w sztukach magicznych wkrótce stają się rozpoznawalne zawiązki wszystkich ważniejszych cech ciała kręgowców: głowa i ogon, plecy i brzuch, oczy, uszy, mózg, umięśnienie, serce, jelita.

Komórki włączają różne zespoły genów zgodnie ze swoim umiejscowieniem i historią rozwojową

Przemieszczenia prowadzące do powstawania części ciała są poprzedzone zmianami biochemicznymi; komórki w różnych okolicach zarodka wytwarzają różne zestawy białek, które kontrolują ich przyczepialność, ruchliwość i biochemiczne przeznaczenie. W czasie gdy większość komórek w zarodku wygląda podobnie, długo zanim zostaną wyraźnie zróżnicowane, można wykazać znaczne różnice w układzie ekspresji różnych genów kodujących białka regulatorowe (rys. 19-41). Głównym problem rozwoju, a według niektórych — najważniejszym problemem rozwoju jest zrozumienie mechanizmu tworzącego zarówno te początkowe, jak i rozwijające się później zawiłe przestrzenne układy ekspresji genów. Co informuje każdą komórkę zarodka, aby włączyła specyficzny zestaw genów, odpowiedni do jej umiejscowienia?

U wielu gatunków pochodzenie układu ciała może być odwzorowaniem asymetrii w samym jaju lub w jego pierwotnym otoczeniu. Początkowe asymetrie prowadzą do różnic między komórkami tworzonymi podczas bruzdkowania i te wczesne różnice powodują potem dalsze zmiany na zasadzie ciągłej kaskady. Ogólnie, komórki działają jako źródło cząsteczek sygnałowych, które wpływają na inne komórki w ich otoczeniu. Sąsiednie komórki różnie oddalone od takiego źródła są eksponowane na sygnały z różnym nasileniem, co wywołuje różne odpowiedzi. Niektóre z reagujących komórek wytwarzają nowe sygnały w odpowiedniej kolejno-



Rys. 19-42. Udoskonalanie układu przez powtarzalne sygnały. Seria sygnałów wywołująca zmiany charakteru komórek może prowadzić do wytworzenia złożonego układu obejmującego wiele rodzajów komórek, rozpoczynając od prostego układu dotyczącego tylko kilku komórek

ści. W ten sposób pierwotny prosty plan zostaje modyfikowany i stopniowo wypełniany drobniejszymi i bardziej skomplikowanymi szczegółami (rys. 19-42).

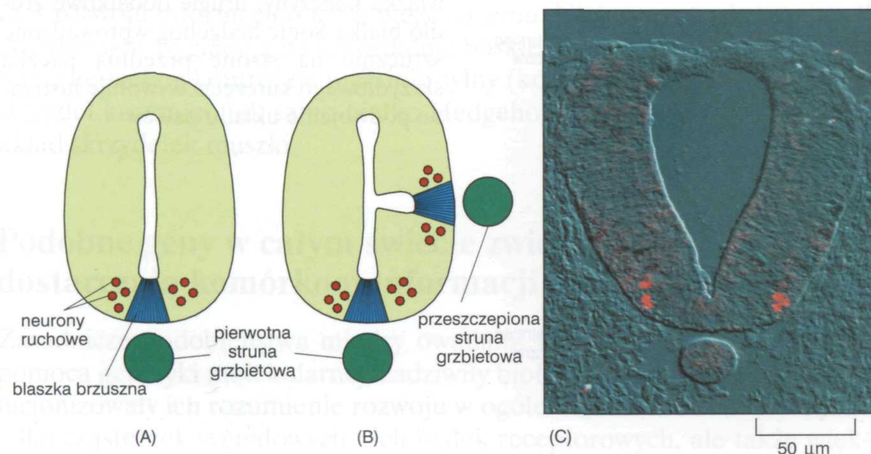
W procesie **formowania układu ciała** każda komórka jest eksponowana na serię sygnałów. Sygnały są przejściowe, lecz komórka ma pamięć. **Pamięć komórkowa** zachowuje wewnętrzny ślad sygnałów, na które komórka była eksponowana — zapis historii zaznaczony w genomie w postaci utrzymujących się stałych stanów aktywacji lub represji poszczególnych genów (rozdz. 8). W ten sposób zachowanie się komórki jest kierowane nie tylko przez sygnały z jej obecnego otoczenia, lecz także przez akumulację zapamiętanych informacji. Można przytoczyć tysiące przykładów takiej zasady formowania układu ciała; tu mamy miejsce jedynie na jeden lub dwa.

Pytanie 19-9. Podczas wczesnego rozwoju wielu gatunków komórki dzielą się niezmiernie szybko i dochodzi do blokowania transkrypcji, w wyniku czego nie wytwarza się nowy mRNA. Zatem transkrypcja nie może być regulowana. Czy oznacza to, że komórki nie mogą się w swym obrębie zróżnicować, jeśli chodzi o zestaw produktów genowych, które są w nich czynne? Wytłumacz odpowiedź.

Rozproszone sygnały mogą dostarczać komórce informacji o jej położeniu

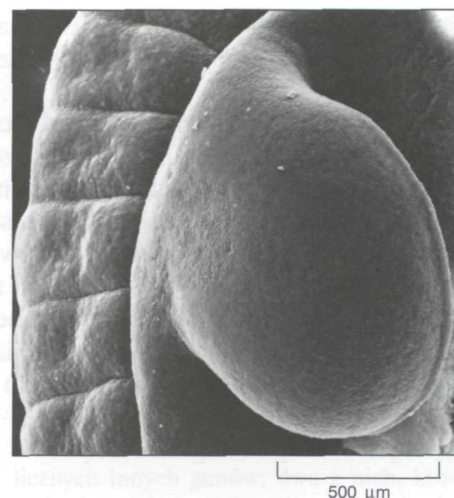
Podczas gastrulacji w embrionach zarodków niektóre komórki, które wnikają do wnętrza, specjalizują się i utrzymują się razem tworząc pałeczkowatą strukturę — *strunę grzbietową* (można ją zobaczyć na rys. 19-25B). Jest ona prekursorem kręgosłupa i wyznacza centralną oś ciała. Powyżej struny grzbietowej leży *płytka nerwowa*, duża grupa komórek nabłonkowych na zewnętrznej stronie zarodka, która zwija się tworząc cewę nerwową (patrz rys. 19-25A). Struna grzbietowa wysyła sygnały kontrolujące miejscową specjalizację komórek w obrębie płytki i cewy nerwowej. Te komórki, które leżą w linii pośrodkowej, najbliżej struny grzbietowej, różnicują się w struktury zwane *blaszką brzuszną*; komórki trochę dalej od struny grzbietowej, po obu stronach blaszki brzusznej, specjalizują się jako prekursory neuronów ruchowych (rys. 19-43A). Jeżeli wszczepimy drugą strunę grzbietową do zarodka kurczęcia, bocznie od linii pośrodkowej, rozwinie się druga blaszka brzuszna między neuronami ruchowymi na bocznej stronie ściany ośrodkowego układu nerwowego, obok przeszczepionych komórek (rys. 19-43B).

Sygnał ze struny grzbietowej został zidentyfikowany: jest to wydzielnicze białko sygnałowe, wytwarzane przez gen zwany *sonic hedgehog*. Mutacje tego genu u myszy lub ludzi powodują brak wykształcenia struktur pośrodkowych w ośrodkowym układzie nerwowym; w ekstremalnych przypadkach zarodek rozwija się jako cyklop, z pojedynczym okiem w linii pośrodkowej twarzy i szczątkowym nosem z pojedynczym nozdrzem w środku czoła.



Rys. 19-43. Informacje ze struny grzbietowej kontrolują realizację budowy ośrodkowego układu nerwowego. (A) Schemat przekroju przez prawidłową strukturę; komórki w pobliżu struny grzbietowej otrzymują najsilniejszy sygnał i różnicują się w blaszkę brzuszną, natomiast komórki leżące nieco dalej stają się neuronami ruchowymi. (B) Wynik przeszczepienia drugiej struny grzbietowej w pozycji bocznej względem normalnego położenia. (C) Przekrój przez cewę nerwową i strunę grzbietową dwudniowego zarodka kurczęcia. Neurony ruchowe zaczęły się właśnie rozwijać; ich jądra zostały zabarwione na kolor *czerwony* za pomocą przeciwciał. (C dzięki uprzejmości: Julie Adam)

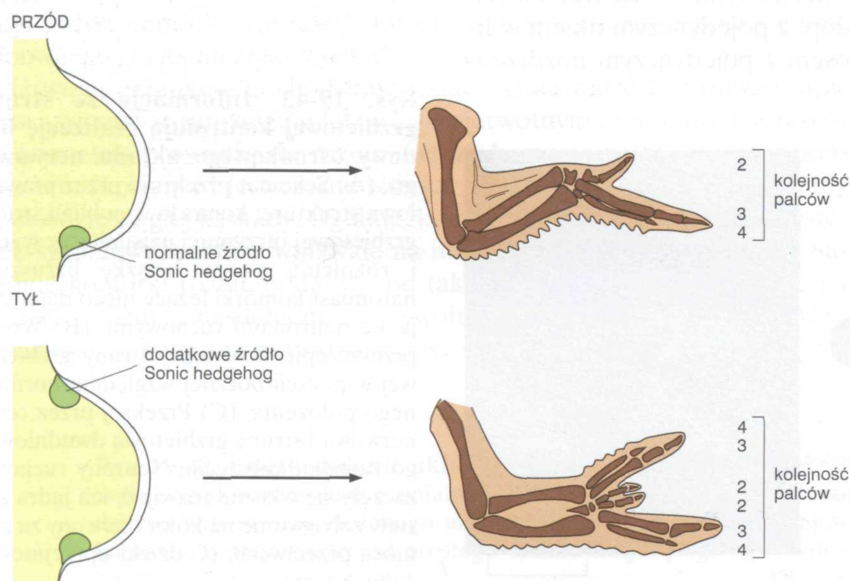
Rys. 19-44. Skaningowa mikrografia elektronowa pączka skrzydłowego zarodka pisklęcia. (Dzięki uprzejmości: Paul Martin)



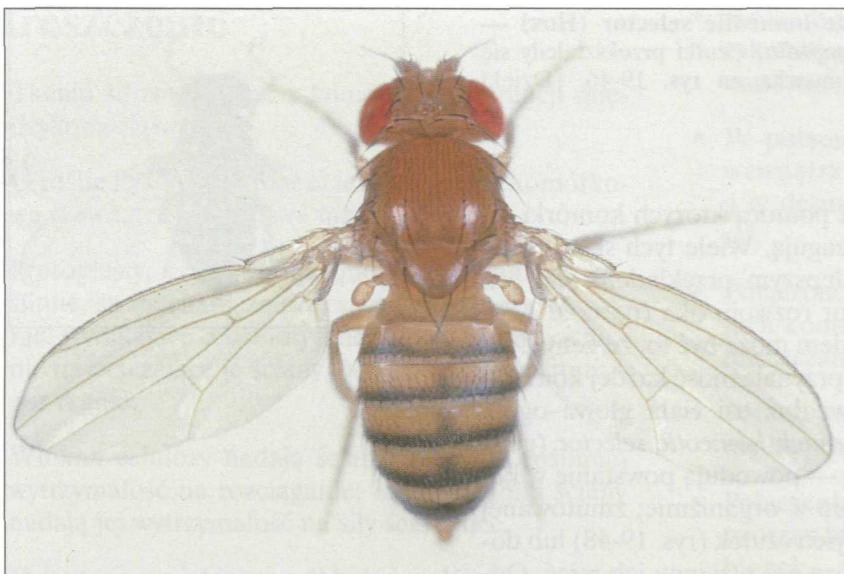
Dysponując sklonowanym genem można uzyskać znakowaną sondę, za pomocą której techniką hybrydyzacji *in situ* można uwidocznić komórki wykazujące ekspresję tego genu (patrz s. 323–324). Metoda ta uwidacznia mRNA stanowiący transkrypt genu *sonic hedgehog* nie tylko w strunie grzbietowej, lecz na przykład także w każdym zawiązku kończyn — językowatych wypustkach po bokach embrionów kręgowców, które wzrastają tworząc nogi, ramiona, skrzydła lub płetwy (rys. 19-44). Ekspresja *sonic hedgehog* jest tutaj ograniczona do małych fragmentów tkanki na tylnej stronie każdego zawiązka (po stronie małego palca). Jeżeli sztucznie wprowadzimy źródło białka Sonic hedgehog na przeciwną, przednią stronę zawiązka kończyny (strona kciukowa), kończyna rozwinie się z lustrzanym podwojeniem palców (rys. 19-45). Charakter każdego rozwijającego się palca — jego długość, kształt i wewnętrzna struktura — jest zdeterminowany przez jego odległość od źródła białka Sonic hedgehog. Najwyraźniej stężenie białka lub niektóre czynniki kontrolowane przez to białko dostarczają komórkom w zawiązkach kończyn *informacji o ich położeniu*. Komórki odpowiadają zmianami ekspresji genów, które regulują sposób, w jaki komórki będą oddziaływać na siebie tworząc kości, ścięgna i skórę poszczególnego typu palca.

Przykład Sonic hedgehog pokazuje, jak jedno takie same białko sygnałowe jest powtarzalnie wykorzystywane na wielu stopniach rozwoju. Różne grupy komórek interpretują ten sam sygnał w różny sposób, zgodnie z zapamiętaną historią rozwojową: komórki ośrodkowego układu nerwowego odpowiadają na silny sygnał tworzeniem blaszki brzusznej, natomiast zawiązki kończyn odpowiadają tworzeniem małych palców. Sonic hedgehog reprezentuje jedną z wielu rodzin białek sygnałowych, których zespół wydaje się odpowiadać za organizację układu ważniejszych części ciała. Dzięki pamięci komórkowej kilka podstawowych mechanizmów sygnałowych najwyraźniej wystarcza do kierowania tworzeniem ogromnej różnorodności wysoko rozwiniętych struktur.

Pytanie 19-10. Studiujesz rozwój jednorożca i podejrzewasz, że Sonic hedgehog może być sygnałem, który wywołuje rozwój rogu na środku jego czoła. Sprawdzisz to za pomocą wstrzyknięcia białka Sonic hedgehog w boczną część głowy; tam rozwija się dodatkowy róg. Tymczasem kolega, także pracujący nad rozwojem jednorożców, odkrywa szczep mutanta jednorożców, u którego Sonic hedgehog nie wykazuje nigdzie ekspresji w sąsiedztwie rozwijającego się rogu, a który mimo to ma normalny róg. Jaki wniosek mógłbyś wyciągnąć na temat roli Sonic hedgehog w indukowaniu tworzenia rogu?



Rys. 19-45. Sonic hedgehog bierze udział w rozwoju kończyny. *Sonic hedgehog* wykazuje normalnie ekspresję w grupach komórek na tylnej stronie zawiązka kończyny; drugie dodatkowe źródło białka Sonic hedgehog wprowadzone sztucznie na stronę przednią pączka skrzydłowego kurczęcia wywołuje lustrzane podwojenie układu palców

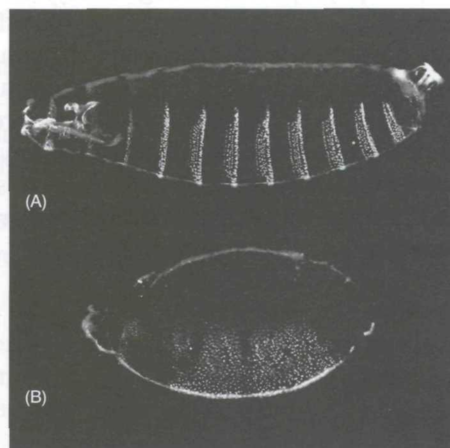


Rys. 19-46. Muszka *Drosophila melanogaster*. (Dzięki uprzejmości: E. B. Lewis)

Badania *Drosophila* dostarczyły klucza do rozwoju kręgowców

U *Drosophila* (rys. 19-46) stosunkowo łatwo można otrzymać i analizować mutanty. Dzięki heroicznej pracy, obejmującej produkcję i badanie setek tysięcy zmutowanych embrionów tej muszki w wielu różnych laboratoriach, można było zidentyfikować prawie każdy gen, którego mutacja prowadzi do widocznych aberracji rozwojowych. Klonując geny kontrolujące rozwój i stosując sekwencje ich DNA jako sondy do poszukiwania podobnych sekwencji DNA w genomie kręgowców, możliwe stało się wykazanie, że większość (prawdopodobnie prawie wszystkie) genów kontrolujących rozwój u *Drosophila* ma swoje homologi wykazujące podobną funkcję u kręgowców. Pełny katalog tych genów u muszki dostarczył w ten sposób klucza do rozwiązania problemów dotyczących rozwoju kręgowców.

Rodzina genów, do których należy *sonic hedgehog* — rodzina genów *hedgehog*, została faktycznie wykryta właśnie tym sposobem. Nazwę swą wzięła od wyglądu embriona *Drosophila*, u którego ten gen jest zmutowany. Mikroskopijne kolce (ząbki), które normalnie występują w pasmach na powierzchni brzusznej larw, u mutanta pokrywają tę powierzchnię w całości, odzwierciedlając radykalne zmiany w organizacji każdego segmentu budującego ciało owada (rys. 19-47). Podobnie jak u kręgowców, białko działa powtarzalnie w różnym czasie i dostarcza komórkom podczas rozwoju informacji o ich umiejscowieniu. Niektóre z funkcjonalnych podobieństw wyglądają na absurdalnie bliskie; na przykład, tak jak białko Sonic hedgehog kontroluje przednio-tylny (kciuk do małego palca) układ skrzydeł kurczaka, tak samo białko Hedgehog kontroluje przednio-tylny układ skrzydełek muszki.



Rys. 19-47. Mutacja *hedgehog* u *Drosophila*. (A) Prawidłowa młoda larwa *Drosophila*, wykazująca prążki mikroskopijnych kolców (ząbków) na powierzchni brzusznej. (B) Mutanty w zakresie genu *hedgehog*; kolce pokrywają jednolicie całą powierzchnię brzuszną larwy. (Dzięki uprzejmości: Marcel van den Heuvel, Antonio Jacinto)

Podobne geny w całym świecie zwierzęcym dostarczają komórkom informacji o ich położeniu

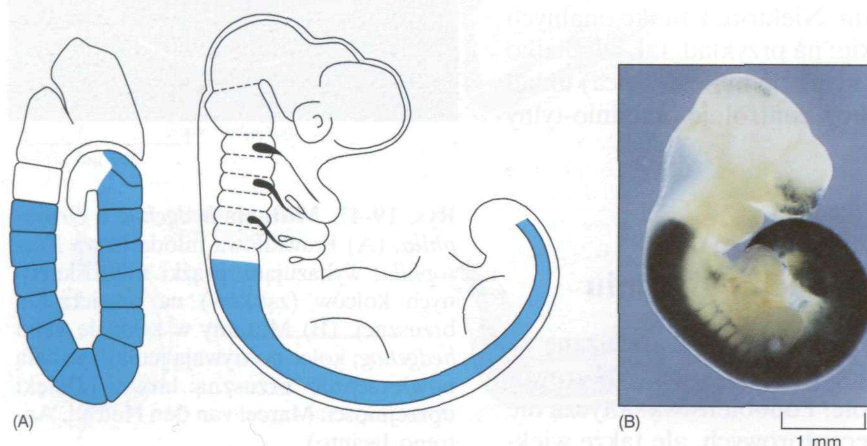
Zasadnicze podobieństwa między owadami i kręgowcami, wykazane za pomocą genetyki molekularnej, zadziwiły biologów rozwojowych i zrewolucjonizowały ich rozumienie rozwoju w ogóle. Podobieństwa dotyczą nie tylko cząsteczek sygnałowych i ich białek receptorowych, ale także więk-

Rys. 19-48. Efekt mutacji w genie homeotic selector (Hox) — w tym przypadku w genie *Antennapedia*. Czułki przekształciły się w nogi; porównaj z prawidłową muszką na rys. 19-46. (Dzięki uprzejmości: Matthew Scott)



szych i złożonych zespołów składników, za pomocą których komórki interpretują i zapisują sygnały oraz na nie reagują. Wiele tych składników jest białkami genów regulatorowych. Najlepszym przykładem jest gen *Pax-6/ey*, który działa jako główny regulator rozwoju oka (patrz s. 273). Jednakże najbardziej pouczającym przykładem może być to, że geny *Drosophila* mają wewnętrzny zapis określający przynależność każdej komórki do poszczególnych segmentów leżących wzdłuż osi ciała głowa–ogon. Mutacje w genach tego zestawu — tzw. *genach homeotic selector* (geny tożsamości segmentów), czyli **genach Hox** — powodują powstanie w komórkach błędnej informacji o ich położeniu w organizmie; zmutowanej muszce mogą wyrastać nóżki z głowy w miejscu czułek (rys. 19-48) lub dodatkowe skrzydełka z segmentów ciała, które nie powinny ich mieć. Odpowiednio do pojedynczego zestawu genów Hox muszki, kręgowce mają cztery zestawy, wszystkie homologiczne do zestawu muszki i wszystkie podobnie zaangażowane w określaniu różnic między komórkami wzdłuż głównej osi ciała głowa–ogon (rys. 19-49). Obecnie geny Hox zostały odnalezione, jako wykazujące podobną funkcję w ułożeniu głównej osi ciała, nie tylko u owadów i kręgowców, lecz także u mięczaków, robaków i stułbiopławów — właściwie praktycznie we wszystkich gromadach zwierząt. Podobnie jak cząsteczki sygnałowe, dostarczające informacji o położeniu, geny Hox zapisują je w pamięci komórkowej i są wykorzystane w różnych częściach ciała — np. w kończynach kręgowców, jak również wzdłuż głównej osi ciała.

Postępy ostatnich lat w biologii rozwojowej były szybkie i przypominały układanie puzli. Rozproszone fragmenty zaczynają pasować teraz jako części spójnej całości. Organizmy, które kiedyś były uznawane za zdecydowanie różne, obecnie zostały określone jako zasadniczo podobne. Coraz bardziej wydaje się, że cud rozwoju nie leży w złożoności wyniku, lecz we wspaniałej prostocie sposobu, w jaki jest osiągany. W czasie długiego procesu ewolucyjnego stosunkowo prosty zestaw „sztuczek" biologii komórkowej był powtarzalnie stosowany i adaptowany w niekończących się pomysłach kierujących zachowaniem się komórek, co pozwoliło osiągnąć całą fantastyczną różnorodność zwierząt wielokomórkowych, które dzisiaj znajdujemy na ziemi.



Rys. 19-49. Geny Hox wyznaczają położenie wzdłuż osi głównej ciała prawie u wszystkich zwierząt. (A) Rysunek układu ekspresji genu *Antennapedia* w zarodku *Drosophila* (*po lewej*) w porównaniu z odpowiadającym mu genem Hox (*Hoxb-6*) zarodka myszy (*po prawej*). Ekspresja genu *Antennapedia* lub jego odpowiednika mówi komórkom, że są zlokalizowane w tylnej, a nie w przedniej części embrionu; w zmutowanej muszce, pokazanej na rys. 19-48, gen ten wykazuje nieodpowiednią ekspresję w komórkach, które powinny tworzyć czułki (struktury przednie), a które z tego powodu wytwarzają nóżki (struktury tylne). (B) Fotografia układu ekspresji genu Hox (*Hoxb-4*) u myszy pokazuje, jak rozgranicza on tkanki tylne od przednich. Różne geny Hox mają swoje granice ekspresji na różnych poziomach wzdłuż osi ciała. (B dzięki uprzejmości: Robb Krumlauf)

Streszczenie

- Tkanki są zbudowane z komórek i substancji międzykomórkowej.
- U roślin każda komórka otacza się ścianą komórkową (zewnątrzkomórkową matriks).
- Protoplasty, czyli pozbawione ściany komórki roślinne, są mechanicznie wrażliwe, ale mogą wywierać, wynikające z osmotycznego pęcznienia, ciśnienie na otaczające je ściany, utrzymując przez to turgor tkanki.
- Włókna celulozy nadają ścianie komórki roślinnej wytrzymałość na rozciąganie; inne składniki ściany nadają jej wytrzymałość na siły ściskające.
- Orientacja, w jakiej są odkładane włókna celulozowe, narzuca kierunek wzrostu rośliny.
- Tkanki łączne zwierzęce zapewniają mechaniczną podporę i zbudowane są z substancji międzykomórkowej oraz nielicznych rozproszonych komórek.
- Składniki organiczne substancji międzykomórkowej są wytwarzane przez znajdujące się tam komórki tkanki łącznej (zwane w wielu tkankach łącznych fibroblastami).
- Wytrzymałość na rozciąganie substancji międzykomórkowej zwierząt jest zapewniona przez białko włókienkowe — kolagen.
- Siły mechaniczne są przenoszone z cytoszkieletu komórek tkanki łącznej na włókna kolagenowe poprzez białka transbłonowe, integryny i zewnątrzkomórkowe białko adaptorowe — fibronektynę.
- Glikozoaminoglikany (GAG) tworzące w połączeniu z białkami proteoglikany, działają jako wypełniacze wolnych przestrzeni i zapewniają odporność na ściskanie.
- GAG są ujemnie naładowanymi polisacharydami, a przyciągany przez nie obłok małych, dodatnio naładowanych jonów powoduje wciąganie wody w drodze osmozy, zwiększając ciśnienie osmotyczne.
- Komórki połączone razem tworzą warstwy wyściełające zewnętrzne i wewnętrzne powierzchnie ciała zwierząt.
- W nabłonku, w odróżnieniu od tkanki łącznej, siły mechaniczne są przenoszone bezpośrednio z komórki na komórkę za pomocą połączeń międzykomórkowych.
- Białka z rodziny kadheryn przenikają błony komórek nabłonkowych i łączą się z podobnymi kadherynami sąsiednich komórek nabłonkowych.
- W połączeniach zwierających kadheryny łączą się wewnątrz komórek z filamentami aktynowymi, a w desmosomach z filamentami cytokeratynowymi.
- Połączone wiązki filamentów aktynowych sąsiednich komórek mogą się kurczyć i wywoływać przemieszczanie nabłonka.
- Półdesmosomy przyczepiają podstawną powierzchnię komórek do błony podstawnej.
- Połączenia zamykające sklejają komórkę z komórką tworząc barierę uniemożliwiającą dyfuzję przez nabłonek.
- Połączenia komunikacyjne tworzą kanały pozwalające na przechodzenie małych cząsteczek i jonów między komórkami; plazmodesmy u roślin mają taką samą funkcję, ale inną budowę.
- Większość tkanek kręgowców jest skomplikowaną kompozycją różnych typów komórek, które są poddawane ciągłej odnowie.
- Nowe, ostatecznie zróżnicowane komórki powstają z komórek macierzystych.
- Organizacja tkanek jest zapewniona przez komunikację komórkową, wybiórcze przyleganie komórkowe i pamięć komórkową.
- Komórki nowotworowe samolubnie naruszają ograniczenia, które zapewniają prawidłową organizację tkanek; proliferują, kiedy nie powinny, i naciekają okolice, których nie powinny.
- Nowotwory powstają w wyniku akumulacji wielu mutacji somatycznych w pojedynczej linii komórkowej.
- W rozwoju embrionalnym wszystkie komórki dziedziczą ten sam genom z zapłodnionego jaja, a stają się różne przez kontrolowane zmiany ekspresji genów.
- Genom, identyczny w każdej komórce, określa zasady zachowania się komórek, które tworzą układ wielokomórkowego organizmu.
- Komórki są źródłem cząsteczek sygnałowych, które dostarczają sąsiednim komórkom informacji o ich położeniu kierując specjalizacją komórkową.
- Komórka posiada pamięć; przejściowe sygnały pozostawiają długotrwałe efekty w ekspresji genów i zachowaniu komórkowym.

- Układ specjalizacji komórek jest udoskonalany stopniowo za pomocą kolejno działających sygnałów.
- Kilka tych samych podstawowych mechanizmów sygnałowych jest stosowanych powtarzalnie w różnym kontekście.
- Komórki mogą różnie interpretować te same sygnały w zależności od ich genomu i historii rozwojowej.
- Komórki kręgowców i bezkręgowców stosują zasadniczo podobne zespoły genów do przesyłania, wykrywania, interpretowania i zapisywania sygnałów kierujących rozwojem.

Hasła

błona podstawna	glikozoaminoglikany	podstawny	półdesmosomy
desmosomy	kadheryna	połączenia komunikacyjne	rozwój
formowanie schematu budowy	kolagen	połączenia międzykomórkowe	substancja międzykomórkowa
gen supresorowy nowotworów	komórka macierzysta	połączenia zwierające	szczytowy
geny Hox	nowotwór	połączenie zamykające	ściana komórki
	onkogen		tkanka
	pamięć komórkowa		

Pytania

Pytanie 19-11. Które z następujących twierdzeń są poprawne? Wytłumacz odpowiedź.

A. Połączenia komunikacyjne (szczelinowe) łączą cytoszkielet jednej komórki z cytoszkieletem komórki sąsiedniej lub z zewnątrzkomórkową matriks.

B. Zwiędnięty liść można przyrównać do dętki rowerowej, z której wypuszczono powietrze.

C. Dzięki swojej sztywnej strukturze proteoglikany mogą wytrzymywać działanie znacznych sił ściskających.

D. Błona podstawna jest wyspecjalizowaną warstwą substancji międzykomórkowej, do której przyczepiają się nabłonki powierzchniowe.

E. Naskórek ulega ciągłemu złuszczaniu i jest odnawiany w ciągu kilku tygodni; aby utrzymać stały tatuaż, jest konieczne deponowanie pigmentu pod naskórkiem.

F. Mimo że komórki macierzyste nie są zróżnicowane, są one zdeterminowane i dlatego powstają z nich tylko specyficzne typy komórek.

Pytanie 19-12. Jak przypuszczasz, która z następujących substancji przechodzi z komórki do komórki przez a) połączenia typu neksus i b) plazmodesmy: kwas glutaminowy, mRNA, cAMP, białko Sonic hedgehog, Ca^{2+}, białko G, fosfolipidy błony komórkowej?

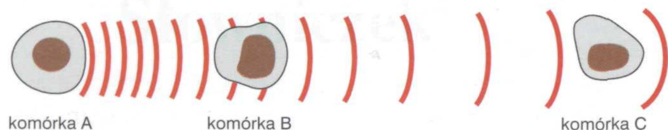
Pytanie 19-13. Przeanalizuj następujące twierdzenie: „Gdyby komórka roślinna miała filamenty pośrednie zapewniające jej wytrzymałość na rozciąganie, wtedy ściany komórkowe byłyby zbędne".

Pytanie 19-14. Przez wymianę małych metabolitów i jonów połączenia neksus umożliwiają połączenie metaboliczne i elektryczne między komórkami. Dlaczego więc przypuszczasz, że neurony komunikują się głównie przez synapsy, a nie przez połączenia neksus?

Pytanie 19-15. Żelatyna jest zbudowana głównie z kolagenu, który jest odpowiedzialny za niezwykłą odporność tkanek łącznych na rozciąganie. Żelatyna jest podstawowym składnikiem galaretek, ale jak już prawdopodobnie sam wielokrotnie doświadczyłeś podczas konsumowania różności o smaku truskawkowym, galaretki nie są w rzeczywistości odporne na rozciąganie. Dlaczego?

Pytanie 19-16. Na stronie 626 stwierdzono: „Budowa [organizmu] jest zdeterminowana przez genom zawarty w komórce jajowej". Jakie są dowody, na których bazuje to twierdzenie? Przyjaciel kwestionuje to i sugeruje, abyś zastąpił DNA w jaju bociana ludzkim DNA i zobaczył, czy powstanie ludzki noworodek. Jak byś mu odpowiedział?

Pytanie 19-17. Na rys. P19-17 przedstawiono dwa zasadniczo różne mechanizmy, za pomocą których sygnały mogą być przenoszone z jednej komórki na inne wpływając na ich rozwój w zależności od względnego położenia 1) cząsteczki sygnałowe wydzielone przez komórkę A rozprzestrzeniają się, a komórki B i C ustalają swoje położenie mierząc stężenie tych cząsteczek (większe dla B — bliżej źródła lub mniejsze dla C — dalej od źródła); albo alternatywnie 2) sygnał jest przekazywany z komórki na komórkę. W drugim wypadku komórka B jest wrażliwa na cząsteczkę sygnałową i odpowiada wydzieleniem własnego sygnału, który jest rozpoznawany





Rys. P19-17

przez komórkę C. Zasugeruj sposób, w jaki można by eksperymentalnie rozróżnić obie możliwości.

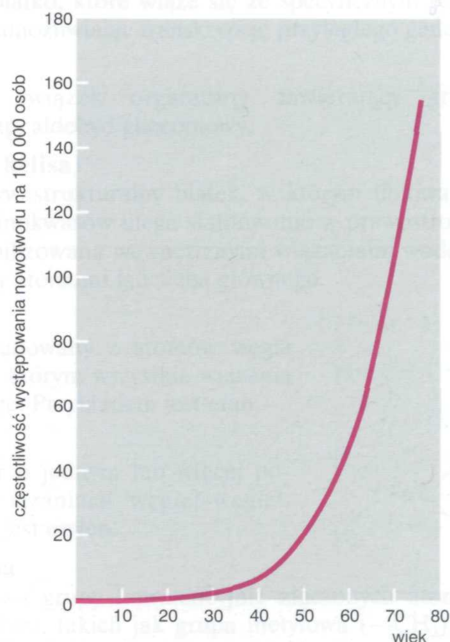
Pytanie 19-18. Białaczki — nowotwory wywodzące się z mutacji, które doprowadzają do nadmiernego wytwarzania krwinek białych — występują średnio we wcześniejszym wieku niż inne nowotwory. Zaproponuj wytłumaczenie, jak do tego dochodzi.

Pytanie 19-19. Ostrożnie rozważ wykres na rys. P19-19, pokazujący liczbę przypadków raka okrężnicy rozpoznanego u 100000 kobiet jako funkcję wieku. Dlaczego ten wykres jest taki stromy i zakrzywiony, jeżeli mutacje występują z podobną częstością przez całe życie?

Pytanie 19-20. Nałogowi palacze i robotnicy narażeni przez ograniczony czas na karcynogeny chemiczne, powodujące mutacje DNA, zwykle nie mają nowotworów charakterystycznych dla ich nałogu lub zawodu przez 10, 20 lub więcej lat. Zasugeruj wytłumaczenie tak długiego opóźnienia.

Pytanie 19-21. Wysokie poziomy hormonów płciowych żeńskich zwiększają występowanie niektórych typów nowotworów. Dlatego niektóre rodzaje wcześniej stosowanych tabletek antykoncepcyjnych zawierających duże dawki estrogenów zostały ostatecznie wycofane z użycia, ponieważ wykazano, że zwiększają ryzyko występowania raków macicy. U męskich transeksualistów stosujących preparaty estrogenowe w celu uzyskania kobiecego wyglądu zwiększa się ryzyko raka piersi. Wysoki poziom androgenów (męskie hormony płciowe) zwiększa ryzyko niektórych innych rodzajów nowotworów, takich jak rak gruczołu krokowego. Czy można wnioskować, że estrogeny i androgeny są mutagenne?

Pytanie 19-22. Dlaczego komórki wydawały się prostsze lub bardziej skomplikowane, niż sądziłeś przed przeczytaniem tej książki? Wytłumacz swoje stanowisko.

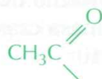


Rys. P19-19

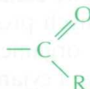
Słowniczek*

acetylo-CoA (acetylo-koenzym A)
Mała cząsteczka rozpuszczalna w wodzie, przenosząca w komórce grupy acetylowe. Zawiera grupę acetylową związaną z koenzymem A (CoA) wiązaniem tioestrowym, łatwo ulegającym hydrolizie.

acetylowa grupa
Grupa chemiczna, pochodna kwasu octowego.



acylowa grupa
Grupa funkcyjna pochodząca z kwasu karboksylowego (R — grupa alkilowa, taka jak grupa metylowa).

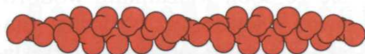


adaptacja
Dostosowanie stopnia wrażliwości komórki lub organizmu zachodzące w wyniku powtarzania się bodźców. Umożliwia komórce odpowiedź nawet wtedy, gdy występuje wysoki poziom podstawowy stymulacji.

ADP (adenozyno-5′-difosforan)
Nukleotyd powstający w drodze hydrolizy końcowego fosforanu ATP. (*Patrz* rys. 3-25).

akson
Długa, cienka wypustka komórki nerwowej, zdolna do szybkiego przewodzenia impulsów nerwowych na duże odległości od perykarionu, a przez to dostarczania sygnałów innym komórkom.

aktynowy filament
Filament białkowy (włókienko białkowe) o grubości ok. 7 nm, utworzone przez dwa łańcuchy globularnych cząsteczek aktyny. Główny składnik cytoszkieletu we wszystkich komórkach eukariotycznych, zwłaszcza licznie występujący w komórkach mięśniowych.

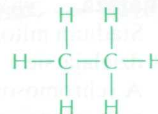


aktywator
U bakterii białko, które wiąże się ze specyficznym regionem DNA, umożliwiając transkrypcję przyległego genu.

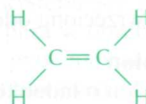
aldehyd
Reaktywny związek organiczny zawierający grupę —CH=O, np. aldehyd glicerynowy.

alfa helisa (α helisa)
Częsty *motyw strukturalny* białek, w którym *liniowa* sekwencja aminokwasów ulega sfałdowaniu w prawostronną helisę, ustabilizowaną wewnętrznymi wiązaniami wodorowymi między atomami łańcucha głównego.

alkan
Związek zbudowany z atomów węgla i wodoru, w którym wszystkie wiązania są pojedyncze. Przykładem jest etan.



alken
Węglowodór o jednym lub więcej podwójnych wiązaniach węgiel–węgiel. Przykładem jest etylen.



alkilowa grupa
Ogólna nazwa grupy kowalencyjnie złączonych atomów węgla i wodoru, takich jak grupa metylowa (—CH_3) lub etylowa (—CH_2CH_3), nie zawierającej wiązań podwójnych.

alkohol
Związek organiczny zawierający grupę hydroksylową (—OH) związaną z nasyconym atomem węgla — np. alkohol etylowy.

allosteryczne białko
Białko, które może istnieć w dwóch lub więcej konformacjach zależnych od związania innej cząsteczki (liganda) w miejscu innym niż miejsce katalityczne tego białka. Białka allosteryczne złożone z wielu podjednostek często wykazują kooperatywną odpowiedź na związanie liganda.

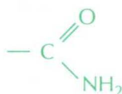
ameby
Ogólna nazwa wolno żyjących jednokomórkowych pełzających organizmów drapieżnych: podgrupa pierwotniaków. *Amoeba proteus* jest gatunkiem dużych ameb żyjących w wodach słodkich, używanym do badań ruchu pełzakowatego.

---

* Podane definicje są przeważnie bardzo uproszczone, a niekiedy wręcz mało precyzyjne. Nie należy więc przyjmować, że są to hasła encyklopedyczne, lecz traktować jako doraźną pomoc przy czytaniu tekstu (*przyp. red. nauk.*).

amfipatyczna (amfofilowa) cząsteczka
Cząsteczka mająca obszar(y) hydrofobowy(e) i hydrofilowy(e), np. fosfolipid lub cząsteczka detergentu.

amid
Cząsteczka zawierająca grupę karbonylową związaną z aminą.



aminokwas
Cząsteczka organiczna zawierająca zarówno grupę aminową, jak i grupę karboksylową. Aminokwasy, w których obie te grupy są związane z tym samym atomem węgla (α aminokwasy), są budulcowymi elementami białek. (*Patrz* panel 2-5, s. 62).

aminowa grupa (—NH_2)
Grupa funkcyjna o słabych właściwościach zasadowych pochodząca z amoniaku (NH_3). W roztworach wodnych grupa aminowa może przyłączyć proton i uzyskać ładunek dodatni.

aminowy koniec — *patrz* **koniec N białka**

AMP (adenozyno-5′-monofosforan)
Jeden z czterech nukleotydów budujących RNA. AMP powstaje w wyniku energetycznie korzystnej hydrolizy ATP. (*Patrz* rys. 3-35.).

anaboliczne
Określenie pojedynczych reakcji lub dróg metabolicznych prowadzących do powstania dużych cząsteczek z cząsteczek małych. Biosyntetyczne.

anaerobowy = beztlenowy
(Komórka, organizm lub proces metaboliczny) działający w nieobecności powietrza, a ściślej mówiąc — w nieobecności tlenu cząsteczkowego.

anafaza
Stadium mitozy, w którym dwa zestawy chromosomów rozdzielają się i odsuwają od siebie. Dzieli się ją na anafazę A (chromosomy przesuwają się w kierunku dwóch biegunów wrzeciona kariokinetycznego) i anafazę B (bieguny wrzeciona oddalają się od siebie).

anion
Jon o ładunku ujemnym, np. Cl^- lub CH_3COO^-.

antygen
Cząsteczka, której fragment jest rozpoznawany przez przeciwciało i wiąże się z nią specyficznie; nazwa pochodzi stąd, że antygen wywołuje odpowiedź immunologiczną, w której są wytwarzane przeciwciała.

antykodon
Sekwencja trzech nukleotydów w cząsteczce transportującego RNA (tRNA), która jest komplementarna do trzynukleotydowego kodonu w cząsteczce informacyjnego RNA; antykodon jest „przypisany" do określonego aminokwasu przyłączanego kowalencyjnie do cząsteczki transportującego RNA.

antyport
Przenoszenie przez białkowy przenośnik w błonach dwóch różnych jonów lub małych cząsteczek poprzez błonę w przeciwnych kierunkach — albo równocześnie, albo sekwencyjnie.

apoptoza — *patrz* **programowana śmierć komórki**

asymilacja (wiązanie) węgla
Proces, w którym rośliny zielone wbudowują atomy węgla z atmosferycznego dwutlenku węgla w cukry. Faza ciemna fotosyntezy.

atom
Najmniejsza cząstka pierwiastka nadal zachowująca jego charakterystyczne właściwości chemiczne.

atomowa liczba
Liczba protonów w jądrze atomu danego pierwiastka.

atomowa masa
Masa atomu danego izotopu wyrażona w daltonach.

ATP (adenozyno-5′-trifosforan)
Trifosforan nukleozydu złożony z adeniny, rybozy i grupy trifosforanowej; główny nośnik chemiczny energii w komórkach. Końcowe grupy fosforanowe są silnie reaktywne w tym sensie, że ich odłączenie w drodze hydrolizy lub przeniesienie do innej cząsteczki zachodzi z wydzieleniem dużej ilości energii swobodnej. (*Patrz* rys. 2-21).

ATP syntaza
Związany z błoną kompleks enzymatyczny, który katalizuje powstawanie ATP w przebiegu fosforylacji oksydacyjnej i fotosyntezy. Występuje w mitochondriach, chloroplastach i u bakterii.

Avogadry liczba
Liczba daltonów (jednostek masy cząsteczkowej) w jednym gramie; równoważna liczbie cząsteczek w M gramów substancji, której masa cząsteczkowa wynosi M daltonów. Ma wartość $6{,}02 \cdot 10^{23}$.

azotu wiązanie
Wbudowywanie azotu atmosferycznego do cząsteczek organicznych prowadzące do utworzenia związków zawierających organiczny azot; przeprowadzane przez bakterie glebowe i cyjanobakterie.

bakteria
Ogólna nazwa dla komórki prokariotycznej. Bakterie dzielą się na dwie wcześnie w ewolucji rozdzielone grupy: eubakterie (inaczej bakterie) i archebakterie (inaczej archea).

bakteriorodopsyna
Purpurowe białko absorbujące światło, obecne w błonie komórkowej bakterii *Halobacterium halobium* zasiedlającej zbiorniki o dużym zasoleniu; w odpowiedzi na światło wypompowuje ona protony z komórki.

beta struktura (struktura β)
Sposób fałdowania białek, w którym sąsiadujące ze sobą rejony łańcucha polipetydowego wiążą się ze sobą wiązaniami wodorowymi wytwarzając sztywną, płaską strukturę, obrazowo określaną jako „harmonijka".



białka wiążące GTP
Grupa białek allosterycznych, których konformacja zależy od związania GTP lub GDP. Obejmuje wiele białek biorących udział w sygnalizacji komórkowej, np. białka G.

białko
Liniowy polimer aminokwasów połączonych w specyficznej sekwencji wiązaniami peptydowymi.

białko błonowe
Białko związane z dwuwarstwą lipidową. Białka integralne są zanurzone w dwuwarstwie i najczęściej spinają obie jej powierzchnie jako białka transbłonowe; białka peryferyczne są związane z powierzchnią dwuwarstwy, najczęściej wiązaniami jonowymi (przeważnie oddziaływaniami elektrostatycznymi).

białko G
Jedno z dużej rodziny białek wiążących GTP, które są ważnymi pośrednimi członami szlaków sygnalizacyjnych. Zazwyczaj jest aktywowane przez związanie hormonu lub innego liganda z receptorem błonowym.

białko motoryczne
Białko, które wykorzystuje energię uzyskaną z hydrolizy ATP do przemieszczania się wzdłuż filamentu białkowego; przykładem miozyna lub kinezyna.

białko regulatorowe genu
Ogólna nazwa dla każdego białka, które wiąże się ze specyficzną sekwencją DNA i zmienia ekspresję genu.

białkowa kinaza — *patrz* **kinazy**

białko włókniste
Białko o wydłużonym kształcie; typowymi przedstawicielami są: kolagen i białko filamentu pośredniego; białka takie mogą się łączyć w długie struktury włókniste.

biegun wrzeciona
Jeden z pary centrosomów np. w komórce zwierzęcej ulegającej mitozie. Mikrotubule wychodzące promieniście z tych centrosomów tworzą wrzeciono mitotyczne.

biochemia
Nauka badająca związki i reakcje chemiczne występujące i przebiegające w żywych organizmach.

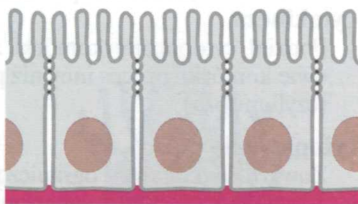
biosyntetyczne
Dotyczące procesów, w których żywe komórki wytwarzają cząsteczki organiczne.

blaszka jądrowa
Włóknista warstwa pod wewnętrzną powierzchnią wewnętrznej błony jądrowej, stanowiąca sieć filamentów pośrednich, zbudowanych z białek jądrowych — lamin.

błona
Cienka dwuwarstwa lipidowa zawierająca białka, która ogranicza wszystkie komórki i rozgranicza poszczególne przedziały wewnątrzkomórkowe, w tym organelle.

błona komórkowa
Błona otaczająca żywą komórkę.

błona podstawna (ang. basal lamina)
Cienka warstwa substancji międzykomórkowej oznaczona na rys. (kolorem *czerwonym*), oddzielająca od tkanki łącznej warstwę komórek nabłonkowych i komórki innych typów, np. komórki mięśniowe lub tłuszczowe. (Nazwa tradycyjna w histologii; tutaj terminu „błona" nie należy mylić z błoną biologiczną, zdefiniowaną jako dwuwarstwa lipidowa zawierająca białka — *przyp. red. nauk.*).



błonowa domena — *patrz* **domena**

błonowe białko transportujące
Każde białko transbłonowe, które umożliwia przenoszenie jonów lub małych cząsteczek z jednej strony błony na drugą.

błonowy potencjał (potencjał transbłonowy)
Różnica potencjałów po obu stronach błony (istniejąca w poprzek błony) wynikająca z niewielkiego nadmiaru dodatnich jonów po jednej stronie błony, a ujemnych jonów po drugiej jej stronie. Typowy potencjał błonowy błony komórkowej zwierząt wynosi –60 mV (ujemny wewnątrz komórki, gdy mierzy się go w stosunku do ośrodka otaczającego komórkę).

błony wewnątrzkomórkowe
Wszystkie błony komórki eukariotycznej poza błoną komórkową. Przykładem są błony retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego.

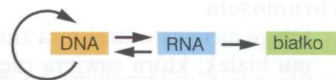
C-kinaza — *patrz* **kinaza C**

C-koniec — *patrz* **koniec C (karboksylowy) białka**

Cdk (kinaza zależna od cyklin)
Kinaza białkowa, która działa tylko w kompleksie z białkiem cykliną. Różne kompleksy Cdk–cyklina uruchamiają różne fazy cyklu komórkowego przez fosforylowanie specyficznych białek docelowych.

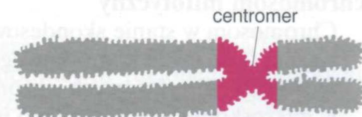
celuloza
Polisacharyd pełniący funkcje strukturalne, zbudowany z długich łańcuchów reszt glukozy połączonych kowalencyjnie. Nadaje ścianom komórek roślinnych odporność mechaniczną.

centralny dogmat
Zasada stwierdzająca, że informacja genetyczna przepływa z DNA do RNA i dalej do białka.



centriola
Cylindryczny układ krótkich mikrotubul występujący zazwyczaj (w komórkach zwierzęcych) jako para w obrębie centrosomu. Podobne struktury występują przy podstawie rzęski i wici, gdzie noszą nazwę ciałek podstawowych.

centromer
Przewężony obszar chromosomu mitotycznego utrzymujący siostrzane chromatydy razem; także to miejsce na DNA, w którym tworzy się kinetochor, jako miejsce przyłączania mikrotubul wrzeciona mitotycznego.



centrosom (centrum komórkowe)
Centralnie umieszczona organella komórki zwierzęcej, będąca pierwotnym centrum organizującym mikrotubule; ulega ona podwojeniu tworząc w mitozie bieguny wrzeciona. Większość komórek zwierzęcych zawiera jedną parę centrioli.

centrum żelazo-siarkowe
Ugrupowanie składające się z atomów żelaza związanych z atomami siarki i z bocznymi łańcuchami cystein, występujące w pewnych typach białek.

chemia organiczna
Dział chemii zajmujący się związkami węgla. Obejmuje w zasadzie wszystkie cząsteczki, z których są zbudowane żywe komórki, poza wodą.

chemiosmotyczne sprzężenie
Mechanizm używający transbłonowego gradientu jonów wodoru (gradientu pH) do zasilania reakcji wymagających doprowadzenia energii, takich jak synteza ATP lub transport cząsteczek przez błonę.

Chlamydomonas
Jednokomórkowy zielony glon o dwóch wiciach.

chlorofil
Barwnik absorbujący światło, który odgrywa główną rolę w fotosyntezie.

chloroplast
Wyspecjalizowana organella u glonów i roślin, zawierająca chlorofile; przebiega w niej fotosynteza.

cholesterol
Cząsteczka lipidu o charakterystycznej strukturze czteropierścieniowego steroidu, stanowiąca ważny składnik błony komórkowej komórek zwierzęcych. (*Patrz* rys. 11-7).

chromatyda
Jedna z dwóch identycznych kopii chromosomu wytworzonych przez replikację DNA, ale nadal złączonych w centromerze; w przebiegu mitozy chromatydy rozłączają się i stają się oddzielnymi chromosomami siostrzanymi.

chromatyna
Kompleks DNA, histonów i białek niehistonowych, występujący w jądrze komórki eukariotycznej. Materiał, z którego jest zbudowany chromosom.

chromosom
Długa niciowata struktura złożona z DNA i towarzyszących mu białek, która zawiera część lub całość genetycznej informacji organizmu. Wyraźnie widoczna w czasie mitozy lub mejozy komórek roślin i zwierząt. (*Patrz też* **interfazowy chromosom; mitotyczny chromosom**).

chromosom interfazowy
Chromosom w stanie zdekondesowanym (rozproszonym), w jakim występuje w interfazie cyklu komórkowego, gdy DNA jest dostępny transkrypcji.

chromosom mitotyczny
Chromosom w stanie skondesowanym, powstałym w mitotycznej fazie cyklu komórkowego. W odróżnieniu od chromosomów interfazowych chromosomy mitotyczne widać w mikroskopie świetlnym jako indywidualne gęste struktury o wyglądzie nici lub pałeczek.

chromosom płci
Chromosom, który może, ale nie musi, być obecny lub może występować w zmiennej ilości kopii, w zależności od płci osobnika. U ssaków chromosomy X i Y. Występuje także u roślin, np. w rodzaju *Melandryum*.

chromosom X
Jeden z dwóch chromosomów płci u ssaków. Komórki osobników męskich zawierają po jednym chromosomie X i Y; osobniki żeńskie zawierają dwa chromosomy X.

chromosom Y
Jeden z dwóch chromosomów płci u ssaków, występujący specyficznie u osobników męskich.

ciałko podstawowe — *patrz* **centriola**

cis
Tuż obok; na przykład sieć *cis* jest tą częścią aparatu Golgiego, która jest umieszczona najbliżej retikulum endoplazmatycznego.

crossing-over
Proces, w którym dwa chromosomy homologiczne pękają w odpowiadających sobie miejscach, następnie łączą się na krzyż, tworząc dwa zrekombinowane chromosomy.

cukier
Substancja zbudowana z węgla, wodoru i tlenu o ogólnym wzorze $(CH_2O)_n$. Węglowodan, sacharyd. „Cukier" używany na co dzień jest specyficznym disacharydem (sacharoza) o słodkim smaku, wytwarzanym przez buraki cukrowe i trzcinę cukrową.

cukrowce (węglowodany)
Ogólna nazwa cukrów i związków pochodnych o wzorze ogólnym $(CH_2O)_n$.

cykl komórkowy
Cykl reprodukcji komórki: uporządkowana sekwencja wydarzeń prowadzących do podwojenia zawartości komórki (w tym informacji genetycznej) i jej podziału na dwie komórki.

cykl kwasu cytrynowego (cykl kwasów trikarboksylowych)
Centralny szlak metaboliczny u wszystkich organizmów, w którym zachodzi utlenienie do CO_2 grup acetylowych pochodzących z cząsteczek pokarmu. W komórkach eukariotycznych reakcje tego cyklu zachodzą w matriks mitochondrialnej.

cyklaza adenylanowa
Enzym błonowy katalizujący powstawanie cyklicznego AMP z ATP. Ważny składnik niektórych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych.

cykliczny AMP (cAMP)
Nukleotyd powstający z ATP w odpowiedzi na hormonalną* stymulację receptorów powierzchni komórki. cAMP działa jako wtórna cząsteczka sygnalizacyjna aktywując kinazę A; jest hydrolizowany do AMP przez fosfodiesterazę.

cyklina
Białko, którego stężenie okresowo zwiększa się i zmniejsza w związku z fazami cyklu komórki eukariotycznej. Cykliny aktywują specyficzne kinazy białkowe (*patrz* Cdk) i przez to biorą udział w kontroli przejścia komórki z jednej fazy cyklu do następnej.

cytochrom
Barwne białko zawierające hem, które przenosi elektrony w procesach oddychania komórkowego i fotosyntezy.

cytokineza
Podział cytoplazmy komórki zwierzęcej lub roślinnej na dwie komórki, proces inny niż podział jądra komórkowego. (czyli mitoza).

cytoplazma
Zawartość komórki ograniczona błoną komórkową, ale w przypadku komórek eukariotycznych nie obejmująca jądra.

---

* Również na stymulację przez pewne przekaźniki nerwowe receptorów metabotropowych w błonie postsynaptycznej w synapsie (*przyp. tłum.*).

cytoszkielet
System filamentów białkowych w cytoplazmie komórki eukariotycznej, który nadaje komórce kształt i zdolność do ruchu ukierunkowanego. Jego najbardziej licznymi składnikami są filamenty aktynowe, mikrotubule i filamenty (włókienka) pośrednie.

cytozol
Wodne środowisko zawierające duże i małe cząsteczki wypełniające główny przedział cytoplazmy. Poza jego obrębem pozostają organelle oddzielone od niego błoną, takie jak retikulum endoplazmatyczne i mitochondria. Zarazem rozpuszczalna frakcja homogenatu komórek.



cząsteczka
Grupa atomów połączonych ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi.

czynnik inicjujący
Białko zapoczątkowujące właściwe związanie rybosomu z mRNA, niezbędne do rozpoczęcia syntezy białka.

czynnik przeżycia
Zewnątrzkomórkowa cząsteczka sygnałowa, której obecność zapobiega programowanej śmierci komórki.

czynnik transkrypcyjny
Nazwa stosowana ogólnie w celu określenia jakiegokolwiek białka potrzebnego do rozpoczęcia lub regulacji transkrypcji u eukariotów. Obejmuje zarówno białka regulacyjne genu, jak i ogólne czynniki transkrypcyjne.

czynnik wzrostu
Zewnątrzkomórkowa peptydowa cząsteczka sygnałowa stymulująca komórkę do wzrostu i proliferacji. Przykładami są naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) i czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF).

czynnik zapoczątkowujący fazę M — *patrz* **MPF**

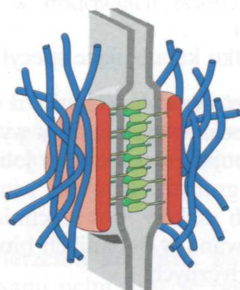
dalton
Jednostka masy cząsteczkowej. Zdefiniowany jako jedna dwunasta masy atomu węgla 12 ($1{,}66 \cdot 10^{-24}$g); w przybliżeniu równy masie atomu wodoru.

denaturacja
Drastyczna zmiana konformacji białka lub kwasu nukleinowego, wywołana wysoką temperaturą lub czynnikami chemicznymi. Zazwyczaj prowadzi do utraty funkcji biologicznej.

dendryt
Wypustka komórki nerwowej zazwyczaj rozgałęziona i krótka, która odbiera bodźce z innych komórek nerwowych.

deoksyrybonukleinowy kwas — *patrz* **DNA**

desmosom
Wyspecjalizowane połączenie międzykomórkowe, zazwyczaj utworzone między dwiema komórkami nabłonkowymi, w którym biorą udział cząsteczki kadheryny, i charakteryzujące się obecnością gęstych płytek białkowych, do których wnikają filamenty pośrednie obu przylegających do siebie komórek.



detergent
Związek o hydrofobowym ogonie i hydrofilowej głowie; powszechnie stosowany przez biochemików do solubilizacji (przeprowadzania w roztwór) białek błonowych i innych cząsteczek hydrofobowych.

dimer
Struktura złożona z dwóch równoważnych podjednostek. Czasem używa się terminu „heterodimer" w sytuacji, gdy dwie podjednostki nie są identyczne.

diploid(alny)
Komórka (organizm) mająca dwa garnitury homologicznych chromosomów, a więc dwie kopie każdego genu lub genetycznych *loci*. (*Patrz też* **haploid**).

disacharyd
Cząsteczka cukrowca, np. sacharozy, składająca się z dwóch jednostek monosacharydowych związanych kowalencyjnie.

DNA (kwas deoksyrybonukleinowy)
Dwuniciowy polinukleotyd utworzony z dwóch oddzielnych łańcuchów monomerów — deoksyrybonukleotydów; jest nośnikiem informacji genetycznej.

DNA biblioteka
Zbiór sklonowanych cząsteczek DNA zazwyczaj reprezentujący albo cały genom (biblioteka genomowa), albo będący zbiorem cDNA skopiowanego z mRNA uzyskanego przez ekstrakcję z próbki komórek lub tkanek (biblioteka cDNA).

DNA klonowanie — *patrz* **klonowanie**

DNA ligaza — *patrz* **ligaza**

DNA naprawa
Zbiorowa nazwa procesów enzymatycznych korygujących niekorzystne zmiany wpływające na ciągłość lub sekwencję cząsteczki DNA.

DNA polimeraza — *patrz* **polimeraza DNA**

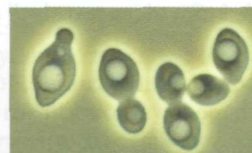
DNA replikacja
Proces wytwarzania kopii cząsteczki DNA.

DNA trankrypcja — *patrz* **transkrypcja**

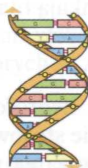
domena
Szczególny region większej struktury. Domena białka jest zwartym i stabilnie sfałdowanym regionem polipeptydu. Domena błony jest obszarem dwuwarstwy o charakterystycznym składzie lipidów i białek (np. szczytowy lub boczno-podstawny region błony komórkowej).

Drosophila melanogaster
Gatunek małej muszki potocznie zwanej owocową; często używany w badaniach genetycznych.

drożdże
Ogólna nazwa wielu rodzin jednokomórkowych grzybów. Obejmuje gatunki zarówno używane do warzenia piwa i pieczenia chleba, jak i gatunki chorobotwórcze.

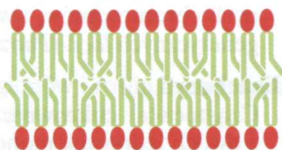


dwuniciowa helisa
Typowa konformacja cząsteczki DNA, w której dwie nici są oplecione wokół siebie tak, że między nićmi dochodzi do utworzenia par zasad.



dwusiarczkowe wiązanie (wiązanie S—S)
Wiązanie kowalencyjne utworzone między dwiema grupami sulfhydrylowymi cystein. Powszechny sposób łączenia dwóch białek lub wiązanie różnych części tego samego białka w przestrzeni międzykomórkowej.

dwuwarstwa lipidowa
Cienka warstwa o grubości równej długości dwóch cząsteczek lipidu, zbudowana głównie z fosfolipidów, tworząca strukturalną podstawę wszystkich błon w komórce. Dwie warstwy cząsteczek fosfolipidów są ułożone hydrofobowymi ogonami do wnętrza, a hydrofilowymi głowami na zewnątrz dwuwarstwy; obie powierzchnie dwuwarstwy są więc eksponowane do środowiska wodnego (fazy wodnej).



dyfuzja
Rozprzestrzenianie się cząsteczek i drobnych cząstek (z jednego miejsca w inne) na skutek przypadkowych ruchów termicznych.

dynamiczna niestabilność mikrotubul
Właściwość polegająca na ustawicznym wydłużaniu się i skracaniu mikrotubul przez dodawanie lub utratę podjednostek tubulinowych na wolnych końcach mikrotubul.

dyneina
Członek rodziny dużych białek motorycznych, które przemieszczają się wzdłuż mikrotubul w sposób zależny od ATP. Dyneina jest odpowiedzialna za uginanie się rzęsek.

egzocytoza
Proces, w którym większość wydzielanych cząsteczek jest eksportowana z komórki eukariotycznej. Cząsteczki są upakowane w błonowych pęcherzykach, które ulegając fuzji z błoną komórkową uwalniają swą zawartość na zewnątrz komórki.

ekson
Segment eukariotycznego genu, który jest przepisywany na mRNA i koduje sekwencję aminokwasową danej części białka. (*Patrz też* **intron**).

eksonów tasowanie
Proces ewolucyjny, dzięki któremu są tworzone nowe geny przez złączenie razem różnych kombinacji początkowo oddzielnych eksonów, kodujących różne domeny białka.

ekspresja genu
Proces, w którym gen wywiera wpływ na komórkę lub organizm, zazwyczaj przez kierowanie syntezą cząsteczki RNA, która ulega translacji do białka o specyficznej aktywności.

elektrochemiczny gradient
Siła napędowa powodująca przemieszczanie jonów przez błonę, wynikająca z różnicy stężenia jonów i potencjału elektrycznego po obu stronach błony.

elektron
Podstawowa cząstka struktury atomu, o jednostkowym ładunku ujemnym (e^-).

elektronu akceptor
Cząsteczka lub atom, która(y) łatwo pobiera elektrony; po przyłączeniu elektronu określa się ją (go) jako zredukowaną(y).

elektronu donor
Cząsteczka, która łatwo oddaje elektron; po oddaniu elektronu określa się ją jako utlenioną.

elektronu przenośnik
Cząsteczka, taka jak cytochrom *c*, która przenosi elektron z cząsteczki donora do cząsteczki akceptora.

elektronu transport
Przechodzenie elektronu z wyższego poziomu energii do poziomu niższego wzdłuż szeregu przenośników elektronów (nazywanego *łańcuchem transportu elektronów*), jak dzieje się to w fosforylacji oksydacyjnej i fotosyntezie.

endocytoza
Pobieranie materiałów do komórki przez wpuklenie błony komórkowej prowadzące do wchłonięcia do cytoplazmy pęcherzyków błonowych. (*Patrz też* **pinocytoza** i **fagocytoza**).

endocytoza z udziałem receptorów (kierowana przez receptory)
Mechanizm selektywnego pobierania zewnątrzkomórkowych materiałów przez komórkę zwierzęcą, w którym makrocząsteczka wiąże się z receptorem błony komórkowej i wnika do komórki z udziałem pęcherzyków opłaszczonych klatryną.

endoplazmatyczne retikulum — *patrz* **retikulum endoplazmatyczne**

energia aktywacji
Dodatkowa ilość energii, jaką cząsteczka musi otrzymać, aby przekroczyć barierę aktywacji, potrzebna do zajścia określonej reakcji chemicznej.

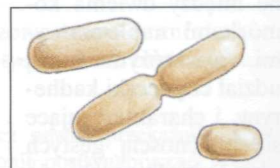
energia swobodna
Energia, którą można pobrać z układu i użyć do wykonania pracy, np. do zasilenia reakcji chemicznej.

energii swobodnej zmiana (ΔG)
„Delta G": różnica energii swobodnej między cząsteczkami substratu i produktu w reakcji chemicznej. Wysoka ujemna wartość ΔG wskazuje, że reakcja ma silną tendencję do spontanicznego przebiegu.

entropia
Termodynamiczna miara stopnia nieuporządkowania (przypadkowości) systemu; im wyższa entropia, tym większe nieuporządkowanie (przypadkowość).

enzym
Białko katalizujące specyficzną reakcję chemiczną.

Escherichia coli (E. coli)
Pałeczkowata bakteria występująca zazwyczaj w jelicie grubym człowieka i innych ssaków, powszechnie używana w badaniach biomedycznych.



eukariota
Organizmy jedno- lub wielokomórkowe o jądrze wyraźnie wyodrębnionym z cytoplazmy. Należą do nich rośliny, zwierzęta, grzyby i pierwotniaki; poza ich obrębem pozostają bakterie (prokariota).

ewolucja
Stopniowe zmiany w populacji żywych organizmów zachodzące w drodze mutacji i naturalnej selekcji przez wiele pokoleń; proces, w którym powstają nowe gatunki żywych organizmów.

$FADH_2$ (zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy)
Jeden z głównych przenośników elektronów czynny w metabolizmie; powstaje w drodze redukcji FAD podczas utleniania substratów oddechowych, np. bursztynianu.

fagocytoza
Proces, w którym cząstki materiałów są pochłaniane przez komórkę. Ważny u drapieżnych pierwotniaków, np. u *Amoeba proteus*, i w niektórych wyspecjalizowanych komórkach zwierząt wielokomórkowych, np. w makrofagach (gr. phagein — jeść).

fagocytująca komórka
Komórka, taka jak makrofag lub neutrofil, która jest wyspecjalizowana we wchłanianiu cząstek lub mikroorganizmów w drodze fagocytozy.

faza G_1
Faza cyklu komórkowego komórki eukariotycznej, między zakończeniem cytokinezy a początkiem syntezy DNA.

faza G_2
Faza cyklu komórkowego komórki eukariotycznej między zakończeniem syntezy DNA a początkiem mitozy.

faza M
Okres cyklu komórkowego komórki eukariotycznej, w którym chromosomy są skondensowane i dochodzi do podziału komórki.

faza S
Okres cyklu komórkowego komórki eukariotycznej, w którym zachodzi synteza DNA.

fenotyp
Widoczny zespół cech komórki lub organizmu.

fermentacja
Rozpad cząsteczek organicznych bez udziału tlenu cząsteczkowego. W porównaniu z procesami tlenowymi, podczas fermentacji utlenianie jest niepełne i wyzwala mniej energii.

fibroblast
Typ komórki powszechnie występujący w tkance łącznej, wydzielający składniki, które tworzą substancję międzykomórkową bogatą w kolagen i inne makrocząsteczki. Z łatwością migruje i proliferuje w hodowlach tkankowych i podczas gojenia się ran.

filament pośredni
Filament białka włóknistego (o średnicy ok. 10 nm) tworzący w komórkach zwierząt wiązki podobne do sznurów. Często odpowiada za odporność mechaniczną na nacisk wywierany z zewnątrz komórki.

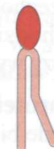
filopodium
Długa, cienka wypustka powierzchni komórek zwierzęcych, zawierająca aktynę. Czasami pełni funkcję poszukiwawczą, np. jako wierzchołek wzrostu rozwijającej się komórki nerwowej.

fosfatazy białkowe (fosfatazy fosfoprotein)
Enzymy usuwające grupy fosforanowe z białek na drodze hydrolizy, często z dużą specyficznością.

fosfatydylocholina
Główny fosfolipid występujący w dużych ilościach prawie we wszystkich błonach komórki. (*Patrz* rys. 11-6).

fosfolipaza C
Enzym w błonie komórkowej przeprowadzający krytyczny etap w fosfatydyloinozytolowym szlaku sygnalizacyjnym: rozszczepia cząsteczkę fosfatydyloinozytolu na diacyloglicerol (DAG) i trisfosforan inozytolu (IP_3).

fosfolipid
Typ cząsteczki lipidu występujący w błonach biologicznych. Ogólnie złożony z dwóch kwasów tłuszczowych związanych poprzez fosfoglicerol z jedną z wielu grup polarnych różnego typu.



fosforylacja oksydacyjna
Proces, w którym u bakterii i w mitochondriach synteza ATP napędzana jest transportem elektronów z substratów oddechowych do tlenu cząsteczkowego. W procesie tym pośredniczy gradient pH wytworzony w poprzek błony, który zasila syntezę ATP w drodze sprzężenia chemiosmotycznego.

fosforylowanie (fosforylacja)
Kowalencyjne wiązanie grupy fosforanowej do małej cząsteczki lub białka. W komórce fosforylacje są katalizowane przez enzymy (kinazy), a źródłem grupy fosforanowej jest najczęściej ATP.

fotosynteza
Proces, w którym rośliny i pewne bakterie używają energii światła słonecznego do zasilania syntezy cząsteczek organicznych z dwutlenku węgla i wody.

fotosystem
Duży kompleks wielu białek zawierający chlorofil, wychwytujący energię światła.

fragmoplast
Struktura zbudowana z mikrotubul i pęcherzyków błonowych, która powstaje w równikowym obszarze dzielącej się komórki roślinnej.

gameta
Komórka organizmu diploidalnego przenosząca tylko pojedynczy garnitur chromosomów i wyspecjalizowana do rozmnażania płciowego. Plemnik lub komórka jajowa.

gen
Region DNA kontrolujący odrębną cechę dziedziczną organizmu, zazwyczaj odpowiadający jednemu białku lub jednemu RNA.

genetyczny kod — *patrz* **kod genetyczny**

genom
Całkowita informacja genetyczna zawarta w komórce lub organizmie (lub cząsteczki DNA niosące tę informację).

genotyp
Zestaw genów zawartych w poszczególnej komórce lub organizmie.

glikogen
Polisacharyd zbudowany wyłącznie z glukozy, używany w komórkach zwierząt jako zapas energii. Duże ziarnistości glikogenu występują szczególnie licznie w komórkach wątroby i mięśni.

glikokaliks
Płaszcz pokrywający powierzchnię komórki, zbudowany z polisacharydów, włącznie z polisacharydowymi częściami proteoglikanów i oligosacharydów złączonych z cząsteczkami białek lub lipidów błony komórkowej.

glikolipid
Cząsteczka lipidu błonowego o krótkim łańcuchu cukrowym przyłączonym do hydrofobowego ogona.

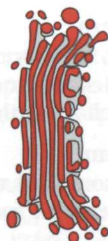
glikoliza
Wszechobecny szlak metaboliczny w cytozolu, w którym dochodzi do częściowego rozkładu cukrów, czemu towarzyszy wytwarzanie ATP (gr. „rozpad cukru").

glikoproteina
Każde białko, które ma kowalencyjnie przyłączony łańcuch oligosacharydowy, jeden lub więcej. Glikoproteinami jest większość białek wydzielanych i większość białek eksponowanych na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej.

globularne białka
Każde białko o kształcie w przybliżeniu kulistym; należy tu większość enzymów.

glukoza
Sześciowęglowy cukier o podstawowym znaczeniu dla metabolizmu komórek. Przechowywana w formach polimerowych jako glikogen w komórkach zwierząt i jako skrobia w komórkach roślin. (*Patrz* panel 2-3, s. 56–57).

Golgiego aparat
Organella tworząca system błon w komórkach eukariotycznych, w której białka i lipidy utworzone w retikulum endoplazmatycznym są modyfikowane i sortowane. (Nazwa pochodzi od odkrywcy Camillo Golgiego).



grupa tiolowa — *patrz* **sulfhydrylowa grupa**

GTP (guanozyno-5´-trifosforan)
Główny trifosforan nukleozydu działający w syntezie RNA i w pewnych reakcjach przenoszenia energii. Odgrywa szczególną rolę w tworzeniu mikrotubul, syntezie białka i sygnalizacji komórkowej.

hamowanie przez sprzężenie zwrotne
Forma kontroli metabolicznej, w której końcowy produkt łańcucha reakcji enzymatycznych osłabia aktywność jednego z pierwszych enzymów tego szlaku.

haploid
Komórka (organizm) mająca tylko jeden garnitur chromosomów, np. plemnik lub bakteria. (*Patrz też* **diploid**).

harmonijka β — *patrz* **beta struktura**

helisa
Wydłużona struktura skręcona regularnie wokół centralnej osi, w kształcie korkociągu.



α helisa — *patrz* **alfa helisa**

heterochromatyna
Region chromosomu, który podczas interfazy pozostaje niezwykle skodensowany i nieaktywny transkrypcyjnie.

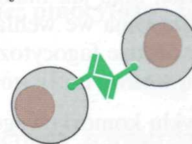
heterodimer — *patrz* **dimer**

hipertoniczny
(O roztworze, w którym przebywa komórka). Zawierający dostatecznie duże stężenie substancji rozpuszczalnych, aby spowodowało to wychodzenie wody z komórki w drodze osmozy (gr. hyper = ponad).

hipotoniczny
(O roztworze, w którym przebywa komórka). Zawierający dostatecznie małe stężenie substancji rozpuszczalnych, aby woda mogła wnikać do komórki na zasadzie osmozy (gr. hypo = poniżej).

histony
Jedna z grup białek zasadowych, bogatych w argininę i lizynę, związanych z DNA w chromosomach.

homofilowa
(O cząsteczce działającej adhezyjnie). Wiążąca się z innymi cząsteczkami tego samego rodzaju.



homolog
1. Chromosom homologiczny. 2. Makrocząsteczka ewolucyjnie bliska innej cząsteczce.

homologiczny
Podobny pod względem wspólnego pochodzenia ewolucyjnego. Homologiczne geny i białka zazwyczaj wykazują podobieństwa sekwencji.

homologiczny chromosom
Jedna z dwóch kopii określonego chromosomu w komórce diploidalnej; jedna od ojca, a druga od matki.

hormon
Sygnał chemiczny wytwarzany przez określony zestaw komórek wielokomórkowego organizmu i przenoszony przez układ krążenia do odległych tkanek docelowych, na które wywiera specyficzne działanie.

hybrydyzacja
Procedura doświadczalna, w której umożliwia się selektywne związanie ze sobą dwóch komplementarnych nici kwasu nukleinowego; ważna technika wykrywania specyficznych sekwencji nukleotydów.

hybrydyzacja *in situ*
Technika, w której używa się jednoniciowego RNA lub DNA jako sondy do umiejscowienia genu albo cząsteczki mRNA w komórce lub tkance.

hydrofilowa
Naładowana lub polarna cząsteczka bądź część cząsteczki, która tworzy dostateczną liczbę wiązań wodorowych z wodą, aby być w niej łatwo rozpuszczalna (gr. „kochający wodę").

hydrofobowa (lipofilowa)
Cząsteczka niepolarna lub część cząsteczki, która nie może oddziaływać z cząsteczkami wody przez wytworzenie korzystnych wiązań i dlatego jest nierozpuszczalna w wodzie. (gr. „nienawidzący wody").

hydroksylowa grupa (—OH)
Grupa chemiczna zawierająca atom wodoru związany z tlenem, jak w alkoholu.

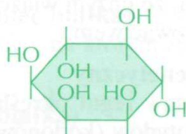
hydroliza (przymiotnik **hydrolityczny)**
Rozcięcie (rozszczepienie) wiązania kowalencyjnego, któremu towarzyszy dodanie wody, przy czym —H jest dodawany do jednego z produktów rozszczepienia, a —OH do drugiego.

hydroniowy jon — *patrz* **jon hydroniowy**

hydrosulfidowa grupa — *patrz* **sulfhydrylowa grupa**

informacyjny RNA (mRNA)
Cząsteczka RNA, która określa sekwencję aminokwasów w białku. Powstająca (u eukariotów) w drodze splicingu RNA z większej cząsteczki RNA wytworzonej przez polimerazę RNA jako komplementarna kopia DNA. Ulega translacji do białka w procesie katalizowanym przez rybosomy.

inozytol
Cząsteczka „cukru" (ściśle rzecz biorąc alkoholu) o sześciu grupach hydroksylowych stanowiąca cukrowy składnik fosfatydyloinozytoli.



inozytolowy fosfolipid (fosfatydyloinozytol)
Występujący w mniejszości składnik błon komórki, zawierający ufosforylowane pochodne inozytolu; ważny składnik w przekazywaniu sygnałów w komórkach eukariotycznych.

integracja
Proces, w którym jedna cząsteczka DNA ulega połączeniu z inną cząsteczką DNA i staje się fizycznie jej częścią. Jest to na przykład sposób, w który genom retrowirusa zostaje wbudowany do genomu gospodarza.

interfazowy chromosom — *patrz* **chromosom interfazowy**

intron
Region eukariotycznego genu nie kodujący białek, ale przepisywany na cząsteczkę RNA, a następnie wycinany w drodze splicingu RNA podczas tworzenia mRNA. (Nazwa pochodzi z ang. „intervene" = „przeplatać" — segmenty RNA kodujące białko).

in vitro
Termin używany przez biochemików do opisywania procesów zachodzących w izolowanych ekstraktach komórek. Używany również przez biologów komórki na określenie komórek hodowanych poza organizmem (łac. „w szkle").

in vivo
W całych komórkach lub organizmach (łac. „na żywo").

inżynieria genetyczna
Zbiór technik używanych do tworzenia nowych DNA przez łączenie odcinków DNA pochodzących z różnych źródeł. Zrekombinowane cząsteczki DNA są często stosowane w klonowaniu genów, genetycznym modyfikowaniu organizmów i — ogólnie — w biologii molekularnej.

izoforma
Jedna z kilku form tego samego białka, różniących się sekwencją aminokwasów. Izoformy mogą być produktem różnych genów lub odmiennego splicingu RNA przepisywanego z tego samego genu.

izomer
Jedna z grupy substancji zawierających te same atomy i mających ten sam wzór sumaryczny (np. $C_6H_{12}O_6$), ale różniących się przestrzennym ułożeniem tych samych atomów. Izomery optyczne różnią się od siebie tylko tym, że stanowią swoje lustrzane odbicia.

izotop
Jeden z grupy atomów o tych samych właściwościach chemicznych, ale różniących się masą atomową. Może być albo stabilny, albo radioaktywny.

jąderko
Struktura w jądrze, w której zachodzi synteza rybosomowego RNA i montaż podjednostek rybosomów.

jądro
1. W komórce eukariotycznej: główna organella zawierająca DNA zorganizowany w chromosomy. 2. W atomie: centralne skupienie materii o dużej masie, złożone z neutronów i protonów.

jon
Atom lub cząsteczka o ładunku elektrycznym dodatnim lub ujemnym.

jon hydroniowy (H_3O^+)
Jon powstały przez dodanie protonu do cząsteczki wody.

jon wodorowy (H^+)
Proton w roztworze wodnym — podstawa kwasowości. Takie protony łatwo łączą się z cząsteczkami wody tworząc H_3O^+ (*patrz też* **jon hydroniowy**), przez co jony wodorowe *sensu stricto* są rzadkością.

jonowe wiązanie — *patrz* **wiązanie jonowe**

jonowy kanał — *patrz* **kanał jonowy**

kalmodulina (CaM)
Małe białko wiążące Ca^{2+}, które modyfikuje aktywność wielu enzymów i innych białek w odpowiedzi na zmiany stężenia Ca^{2+}.

kaloria
Jednostka ciepła. Jedna kaloria jest to ilość ciepła potrzebna do podwyższenia temperatury 1 g wody o 1°C. Jedna kaloria (cal) = 4,184 dżuli (J).

kanał błonowy
Białko lub kompleks białek, które(y) tworzy w poprzek błony wąski hydrofilowy por, umożliwiający jonom lub małym cząsteczkom bierne przemieszczanie się z jednej strony błony na drugą.

kanał bramkowany ligandem
Kanał jonowy, który otwiera się wtedy, gdy zwiąże małą cząsteczkę, taką jak przekaźnik nerwowy.

kanał bramkowany potencjałem
Białko błonowe umożliwiające selektywne przechodzenie jonów, np. Na^+, przez błonę, które otwiera się pod wpływem zmian potencjału transbłonowego. Występuje głównie w komórkach pobudliwych elektrycznie, takich jak komórki nerwowe i mięśniowe.

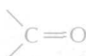
kanał bramkowany uciskiem (mechanicznie)
Białko błonowe umożliwiające selektywne wejście specyficznych jonów do komórki; kanał ten jest otwierany działaniem sił mechanicznych.

kanał jonowy
Białko transbłonowe tworzące w dwuwarstwie lipidowej kanał wypełniony wodą, przez który specyficzne jony nieorganiczne mogą dyfundować zgodnie z ich gradientami elektrochemicznymi.

karboksylowa grupa (—COOH)
Grupa chemiczna składająca się z atomu węgla związanego zarówno z atomem tlenu (wiązaniem podwójnym), jak i z grupą hydroksylową. Cząsteczki zawierające grupę karboksylową są słabymi kwasami (kwasami karboksylowymi).

karboksylowy koniec — *patrz* **koniec C białka**

karbonylowa grupa (—C=O)
Grupa chemiczna składająca się z atomu węgla złączonego podwójnym wiązaniem z atomem tlenu.



kaskada sygnalizacyjna
Sekwencja łączących się ze sobą reakcji białkowych, często obejmująca fosforylowanie i defosforylowanie, działająca jak łańcuch przekaźników przenoszących sygnał w obrębie komórki.

kataboliczna
(O reakcji biochemicznej lub szlaku reakcji). Obejmująca degradację większych cząsteczek do mniejszych, z uwolnieniem energii użytecznej.

katabolizm
Działający w komórce system katalizowanych enzymatycznie reakcji, w którym złożone cząsteczki są rozkładane do prostszych z uwolnieniem energii. Intermediaty takich reakcji określa się czasem jako katabolity.

katalizator
Substancja, która przyspiesza reakcję chemiczną sama nie ulegając zmianie. Enzymy są katalizatorami białkowymi.

kation
Jon naładowany dodatnio, taki jak Na^+ lub $CH_3NH_3^+$.

kilodżul (kJ)
Jednostka energii wyrażona w systemie metr–kilogram–sekunda, równa 0,239 kilokalorii. Masa 2 ton poruszająca się z szybkością 1 metra na sekundę ma energię kinetyczną o wartości dokładnie 1 kilodżula.

kilokaloria (kcal)
Jednostka ciepła równa 1000 kalorii. Używana często do wyrażenia zawartości energii w pokarmach lub cząsteczkach: na przykład siła wiązań jest mierzona w kcal/mol. Ostatnio zastępowana przez inną jednostkę, kilodżul; jedna kilokaloria równa się 4,2 kilodżuli.

kinaza
Enzym przenoszący grupę fosforanową z ATP (lub innego trifosforanu nukleozydu) na inną cząsteczkę.

kinaza A (kinaza białkowa zależna od cAMP)
Enzym, który fosforyluje białka docelowe w odpowiedzi na zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP.

kinaza białkowa
Enzym, który przenosi grupę fosforanową z ATP na specyficzny aminokwas białka docelowego. Komórki zawierają setki różnych kinaz białkowych, fosforylujących różne zestawy białek docelowych.

kinaza C
Kinaza białkowa aktywowana przez Ca^{2+} i diacyloglicerol.

kinazy zależne od cyklin (Cdk) — *patrz* **Cdk**

kinetochor
Złożona struktura białkowa przy chromosomie mitotycznym, do której przyłączają się mikrotubule. Kinetochor jest tworzony przez część chromosomu znaną jako centromer.

kinezyna
Jeden z typów białek motorycznych, które używają energii uzyskanej z hydrolizy ATP do przesuwania się wzdłuż mikrotubul.

klonowanie
Wytwarzanie wielu identycznych kopii cząsteczki DNA, komórki, a nawet całego organizmu.

K_M (stała Michaelisa)
Stężenie substratu, przy którym enzym działa z połową maksymalnej szybkości. Duże wartości K_M zazwyczaj wskazują, że enzym wiąże się ze swym substratem z małym powinowactwem.

kod genetyczny
Zestaw reguł określających współzależność tripletów nukleotydów (kodonów) w DNA lub RNA z aminokwasami w białkach.

kodon
Sekwencja trzech nukleotydów w cząsteczce DNA lub mRNA, która zawiera instrukcję do wbudowania określonego aminokwasu w łańcuch polipeptydowy.

koenzym A (CoA)
Mała cząsteczka biorąca udział w enzymatycznym przenoszeniu grup acylowych w komórce. (*Patrz też* acetylo-CoA i rys. 3-30).

kolagen
Włókniste białko bogate w glicynę i prolinę, stanowiące w tkankach zwierzęcych główny składnik substancji międzykomórkowej. Istnieje w wielu formach: typ I, najczęstszy, występuje w skórze, ścięgnach i kościach; typ II występuje w chrząstce szklistej; typ IV występuje w błonie podstawnej itd.

komórka
Podstawowa jednostka budująca żywe organizmy; jest wodnym roztworem cząsteczek organicznych odgraniczonym od otoczenia błoną. Wszystkie komórki powstają z komórek już istniejących, zazwyczaj przez proces podziału na dwie komórki.

komórka jajowa
Komórka płciowa organizmu żeńskiego, zazwyczaj duża, pozbawiona możliwości ruchu, o bardzo dużej ilości cytoplazmy.

komórka nerwowa — *patrz* **neuron**

kompleks molekularny
Zespół cząsteczek, zazwyczaj makrocząsteczek, utrzymywanych wiązaniami niekowalencyjnymi i wykonujących specyficzną funkcję, taką jak replikacja DNA lub synteza fosfolipidów.

komplementarne
(O dwóch sekwencjach kwasów nukleinowych). Zdolne do precyzyjnego złączenia par obu sekwencji przez dopasowa-

nie G z C oraz A z T lub U, podobnie jak w dwuniciowej helisie DNA.

komplementarny DNA (cDNA)
Cząsteczka DNA wytworzona jako kopia mRNA i dlatego pozbawiona intronów obecnych w genomowym DNA. Używany do oznaczania sekwencji aminokwasów danego białka przez sekwencjonowanie DNA oraz do wytworzenia dużych ilości białka przez klonowanie, a następnie ekspresję.

kondensacja
Typ reakcji chemicznej, w której dwie cząsteczki organiczne łączą się ze sobą wiązaniem kowalencyjnym z równoczesnym wydzieleniem cząsteczki wody. Nazywana także reakcją odwodnienia (dehydratacji) [(Jednak nie każda reakcja odwodnienia jest reakcją kondensacji (*przyp. tłum.*)].

konformacja
Przestrzenne ułożenie atomów w cząsteczce. Ściśle określony trójwymiarowy kształt białka lub innej makrocząsteczki.

koniec C białka (karboksylowy koniec białka)
Ten koniec łańcucha polipeptydowego, na którym znajduje się grupa α-karboksylowa.

koniec N białka (aminowy koniec białka)
Ten koniec łańcucha polipeptydowego, na którym jest wolna grupa α-aminowa.

„kora" komórki (ang. cell cortex) — *patrz* siateczka graniczna

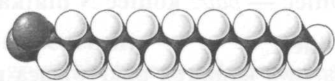
korekta
Na przykład proces, w którym polimeraza przesuwając się wzdłuż DNA poprawia własne błędy.

kowalencyjne wiązania — *patrz* wiązania kowalencyjne

kwas
Substancja, która dysocjuje w wodzie, uwalniając protony (jony H^+), odpowiedzialna za małą wartość pH; protony te łączą się z H_2O tworząc jony hydroniowe (H_3O^+).

kwas nukleinowy
RNA lub DNA; stanowi łańcuch nukleotydów złączonych ze sobą wiązaniami fosfodiestrowymi.

kwas tłuszczowy
Związek taki jak kwas palmitynowy, który zawiera grupę karboksylową złączoną z długim łańcuchem węglowodorowym. Stanowi główne źródło energii podczas metabolizmu i punkt wyjścia do syntezy fosfolipidów. (*Patrz* panel 2-4, s. 58).



lamellipodium
Dynamiczna płaska wypustka błony komórkowej komórki zwierzęcej, powstająca zazwyczaj w komórkach migrujących po powierzchni.

ligand
Cząsteczka wiążąca się do specyficznego miejsca białka, zwłaszcza receptora, taka jak hormon lub przekaźnik nerwowy.

ligaza
Enzym, który łączy dwa segmenty DNA lub RNA, zespalając ich końce.

limfocyt
Krwinka biała biorąca udział w swoistej odpowiedzi immunologicznej na obcą cząsteczkę (antygen). Limfocyty B (komórki B) wytwarzają cząsteczki przeciwciał. Limfocyty T (komórki T) rozpoznają obce cząsteczki eksponowane na powierzchni komórek i wiążą je; biorą także udział w regulacji zachowania się limfocytów B.

linia komórkowa
Populacja komórek zdolna do nieskończonych podziałów w warunkach hodowli komórkowej.

linia płciowa (szlak płciowy)
Komórki dające początek gametom (komórkom jajowym lub plemnikom) w wielokomórkowych organizmach roślin lub zwierząt.

lipid
Cząsteczka organiczna zawierająca łańcuch(y) węglowodorowy(e), która jest nierozpuszczalna w wodzie, ale rozpuszcza się łatwo w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych. Jedną z klas tych związków są fosfolipidy, tworzące strukturalną kanwę błon biologicznych.

lipidowa dwuwarstwa — *patrz* dwuwarstwa lipidowa

lipofilowa — *patrz* hydrofobowa

lizosom
Wewnątrzkomórkowa organella otoczona pojedynczą błoną, zawierająca enzymy trawienne. Wnętrze lizosomu jest silnie kwasowe, a jego enzymy są aktywne w kwaśnym pH.

łańcuch boczny
W aminokwasie część cząsteczki nie biorąca udziału w tworzeniu wiązania peptydowego, która nadaje aminokwasowi jego charakterystyczne właściwości.

łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR)
Technika powielania określonych regionów DNA przez wielokrotne cykle polimeryzacji DNA; po każdym z nich następuje krótkie traktowanie wysoką temperaturą w celu rozdzielenia komplementarnych nici.

makrocząsteczka
Cząsteczka polimeru, takiego jak białko, kwas nukleinowy lub polisacharyd, o masie cząsteczkowej większej niż kilka tysięcy daltonów (gr. makros — duży).

makrofag
Komórka występująca w tkankach zwierzęcych, wyspecjalizowana w pobieraniu cząsteczek materiałów w drodze fagocytozy; pochodzi z pewnego typu krwinek białych (gr. makros — duży, phagein — jeść).

masa cząsteczkowa
Masa cząsteczki wyrażona w daltonach.

matriks (substancja) międzykomórkowa (u zwierząt) = **zewnątrzkomórkowa** (u roślin)
Złożona sieć zbudowana z polisacharydów (np. glikozoaminoglikanów lub celulozy) i białek (np. kolagenu) wydzielanych przez komórki. Strukturalny składnik tkanek, który wpływa również na ich rozwój i fizjologię.

matryca
Struktura molekularna służąca jako wzór do wytwarzania innych cząsteczek. Jest nią specyficzna sekwencja nukleotydów w DNA kierująca syntezą nowej nici DNA o sekwencji komplementarnej.

mejoza
Specjalny typ podziału komórki prowadzący do powstania komórki jajowej lub plemnika, obejmujący redukcję garnituru chromosomowego z diploidalnego (podwójnego) do haploidalnego (pojedynczego). Na drodze dwóch kolejnych podziałów jądra podczas jednej tylko rundy replikacji DNA z wyjściowej komórki diploidalnej tworzą się cztery haploidalne komórki potomne (gr. meiosis — zmniejszenie).

metabolizm
Całkowita suma reakcji chemicznych zachodzących w komórce lub wielokomórkowym organizmie.

metabotropowy receptor
Receptor w błonie komórkowej, o siedmiu α helisach transbłonowych współpracujący z trimerowym białkiem G.

metafaza
Stadium mitozy, w którym chromosomy są mocno przyczepione do wrzeciona mitotycznego w jego płaszczyźnie równikowej, ale jeszcze nie rozdzielają się do przeciwnych biegunów.

metylowa grupa (—CH_3)
Hydrofobowa grupa chemiczna pochodząca z metanu (CH_4).

miejsce aktywne
Region cząsteczki enzymu, w którym cząsteczka substratu zostaje związana i poddana katalizowanej reakcji.

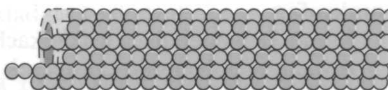
miejsce wiążące
Region powierzchni białka — zazwyczaj jamka lub rowek — którego kształt jest komplementarny względem innej cząsteczki (liganda) i dlatego może ją wiązać wieloma słabymi (niekowalencyjnymi) wiązaniami.

mikro-
Przedrostek oznaczający 10^{-6}.

mikrografia
Fotografia obrazu uzyskanego z mikroskopu. Mikrografia świetlna — z mikroskopu świetlnego, mikrografia elektronowa — z mikroskopu elektronowego.

mikrometr (μm lub mikron)
Jednostka długości równa 10^{-6} metra lub 10^{-4} centymetra.

mikrotubula
Długa, sztywna, cylindryczna struktura wewnątrzkomórkowa o średnicy 20 nanometrów, zbudowana z białka tubuliny; jeden z głównych składników cytoszkieletu, dzięki któremu komórki eukariotyczne regulują swój kształt i kontrolują swoje ruchy.



mili-
Przedrostek oznaczający 10^{-3}.

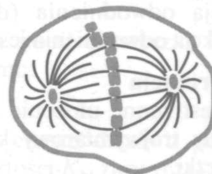
miofibryla (włókienko mięśniowe)
Długa, wysoce zorganizowana, kurczliwa wiązka aktyny, miozyny i innych białek obecna w cytoplazmie komórki mięśniowej; kurczy się za pomocą mechanizmu wślizgiwania się filamentów.

miozyna
Białko motoryczne zużywające ATP do zasilania swego ruchu wzdłuż filamentów aktyny. Miozyna II jest dużym białkiem, które tworzy grube filamenty mięśnia szkieletowego. Mniejsze miozyny, takie jak miozyna I, występują powszechnie i są odpowiedzialne za wiele opartych na aktynie ruchów wewnątrz komórek.

mitochondrium
Organella o dwóch błonach, o wielkości podobnej do bakterii, prowadząca fosforylację oksydacyjną i wytwarzająca większość ATP w komórkach eukariotycznych.



mitotyczne wrzeciono
Układ mikrotubul i związanych z nimi cząsteczek, powstający w czasie mitozy między dwoma biegunami komórki eukariotycznej, służący do rozsuwania podwojonych chromosomów.



mitotyczny chromosom — *patrz* **chromosom mitotyczny**

mitoza
Podział jądra komórki eukariotycznej, obejmujący kondensację DNA w widzialne chromosomy (gr. mitos — nić, co dotyczy niciowego wyglądu skondensowanych chromosomów).

mol
M gramów substancji, gdzie M jest względną masą cząsteczkową. Jeden mol jakiejkolwiek substancji zawiera $6{,}02 \cdot 10^{23}$ cząsteczek.

monomer
Mała cząsteczka, która wiążąc się z takimi samymi lub podobnymi cząsteczkami może tworzyć dużą cząsteczkę. (*Patrz też* **polimer**).

MPF (czynnik zapoczątkowujący fazę M)
Kompleks białkowy zawierający cyklinę i kinazę białkową, który wyzwala wejście komórki w fazę M. (Pierwotnie nazywany czynnikiem zapoczątkowującym dojrzewanie).

mutacja
Zmiana sekwencji nukleotydów w chromosomie, która może być dziedziczna.

N koniec — *patrz* **koniec N białka**

nabłonek
Warstwa komórek pokrywająca powierzchnię zewnętrzną lub wyścielająca jamy ciała.

NAD^+ (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy)
Cząsteczka biorąca udział w reakcji utleniania, działająca przez przyjęcie jonu wodorkowego (H^-) z cząsteczki donora, co prowadzi do powstania NADH, który działa jako zaktywowany nośnik elektronów; ważny w rozkładzie cukrów i tłuszczy wyzwalającym energię. (*Patrz* rys. 3-28).

NADPH (zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego)
Cząsteczka nośnika energii pokrewna NADH, działająca jako donor elektronów w szlakach biosyntetycznych.

nanometr (nm)
Jednostka długości używana do opisywania wymiarów cząsteczek i organelli komórkowych. 1 nm = 10^{-3} μm = 10^{-9} m.

nasycona
(O cząsteczce organicznej). Zawierająca wiązania C—C, ale nie zawierająca wiązań C═C i C≡C.

Nernsta równanie
Wyrażenie ilościowe wiążące stosunek równowagi stężeń jonu — po którejkolwiek stronie przepuszczalnej błony — z różnicą napięcia istniejącą w poprzek tej błony. (*Patrz* rys. 12-27).

neuron (komórka nerwowa)
Komórka o długich wypustkach (akson i dendryty) wyspecjalizowana w przyjmowaniu, przewodzeniu i wysyłaniu sygnałów w układzie nerwowym.



neutron
Istotna cząstka struktury atomowej występująca w jądrze atomu; ma masę zbliżoną do masy protonu, ale nie ma ładunku elektrycznego.

nić opóźniona
Jedna z dwóch nowo tworzonych nici DNA występująca w widełkach replikacyjnych. Nić opóźniona powstaje jako nieciągłe segmenty, które łączą się później kowalencyjnie.

nić wiodąca
Jedna z dwóch nowych nici DNA występująca w widełkach replikacyjnych. Powstaje w drodze nieprzerwanej syntezy w kierunku od 5′ do 3′.

nienasycona
(O cząsteczce organicznej). Zawierająca jedno lub więcej podwójnych lub potrójnych wiązań węgiel–węgiel.

niepolarna cząsteczka
Cząsteczka, w której brak miejscowego nagromadzenia ładunków dodatnich lub ujemnych. Cząsteczki niepolarne są w zasadzie nierozpuszczalne w wodzie.

nierozejście się (nondysjunkcja) chromosomów
Sytuacja występująca czasem podczas mejozy, polegająca na tym, że chromosomy homologiczne nie rozdzielają się, przez co powstająca komórka szlaku płciowego ma albo za dużo, albo za mało chromosomów.

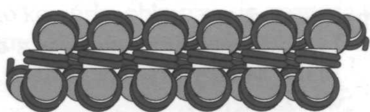
NO — *patrz* **tlenek azotu**

nośnik aktywowany (nośnik energii)
Mała cząsteczka niosąca grupę chemiczną połączoną wiązaniem „wysokoenergetycznym" służąca w wielu różnych reakcjach chemicznych jako dawca (donor) energii lub grupy chemicznej. Przykładami są: ATP, acetylo-CoA oraz NADH.

nowotwór
Choroba powstająca w wyniku mutacji komórek, które wyzwoliły się spod normalnej kontroli, jakiej podlega podział komórek, penetrują tkanki i tam się rozprzestrzeniają.

nukleaza restrykcyjna — *patrz* **restrykcyjny enzym**

nukleosom
Strukturalna jednostka chromosomu eukariotycznego zbudowana z krótkiego odcinka DNA owiniętego wokół rdzenia złożonego z białek histonowych; zasadnicza podjednostka chromatyny.



nukleotyd
Nukleozyd z przynajmniej jedną grupą fosforanową złączoną wiązaniem estrowym z częścią cukrową. Polimerami nukleotydów są DNA lub RNA.

nukleozyd
Związek zbudowany z zasady purynowej lub pirymidynowej związanej z cukrem: rybozą lub deoksyrybozą. (*Patrz* panel 2-6, s. 67).

oddychanie
Ogólna nazwa wszystkich procesów w komórce, w których pobieranie cząsteczek O_2 jest sprzężone z wytwarzaniem CO_2 i dostarczaniem komórce energii.

odwrotna transkryptaza
Enzym obecny w retrowirusach, tworzący kopię DNA na matrycowej cząsteczce liniowego RNA.

ogólny czynnik transkrypcyjny
Każde białko, którego związanie się w pobliżu kasety TATA jest niezbędne do inicjacji transkrypcji większości genów eukariotycznych.

oksydoredukcja — *patrz* **reakcja oksydoredukcyjna**

oligo-
Przedrostek oznaczający obiekt składający się z małej ilości podjednostek, np. krótki polimer. Oligomer (krótki polimer) może być zbudowany z aminokwasów (oligopeptyd), cukrów (oligosacharyd) lub nukleotydów (oligonukleotyd). (gr. oligos — niewiele lub mało).

onkogen
Gen, który przekształca komórkę w komórkę nowotworową. Typowo jest zmutowaną formą prawidłowego genu (protoonkogenu) biorącego udział w kontrolowaniu wzrostu i podziału komórki.

organella
Wyodrębniona struktura lub przedział w komórce eukariotycznej, wyspecjalizowana w pełnieniu szczególnej funkcji; jest strukturą komórkową, która może być widoczna w mikroskopie świetlnym. Przykładami są mitochondria i aparat Golgiego.

orzęski
Typ jednokomórkowych organizmów eukariotycznych (pierwotniaków) charakteryzujący się licznymi rzęskami na powierzchni komórki. Rzęski służą do pływania, pobierania pokarmu lub chwytania zdobyczy.

osmotyczne ciśnienie
Ciśnienie wody, które musi być przyłożone do półprzepuszczalnej błony, aby zrównoważyć tendencję wody do przepływania przez błonę na zasadzie osmozy.

osmoza
Przechodzenie cząsteczek wody przez błonę półprzepuszczalną, którego napędem jest różnica stężeń rozpuszczalnych substancji po obu stronach błony. Błona musi być przepuszczalna dla wody, ale nieprzepuszczalna dla rozpuszczonych cząsteczek.

otoczka jądrowa
Otoczka osłaniająca jądro w komórce eukariotycznej. Składa się z dwóch błon zbudowanych z dwuwarstwy lipidowej — zewnętrznej i wewnętrznej — w których są zawarte pory jądrowe łączące wnętrze jądra z cytoplazmą (umożliwiające przepływ substancji między wnętrzem jądra a cytoplazmą).

para zasad
Dwa nukleotydy w cząsteczce RNA lub DNA złączone w parę wiązaniami wodorowymi — na przykład G z C, A z T lub U.

patch-clamp (metoda)
Technika, w której końcówka miniaturowej elektrody szklanej jest ściśle złączona z łatką błony komórkowej, co umożliwia zapis przepływu prądu przez pojedyncze kanały jonowe zawarte w tej łatce.

PCR — *patrz* **łańcuchowa reakcja polimeryzacji**

peroksysom
Mała organella otoczona pojedynczą błoną, utleniająca cząsteczki organiczne za pomocą tlenu cząsteczkowego. Zawiera pewne enzymy wytwarzające nadtlenek wodoru oraz enzymy rozkładające ten nadtlenek (H_2O_2).

perykarion
Główna część komórki nerwowej (neuronu) zawierająca jądro; dalszymi częściami tej komórki są: akson i dendryty.

pęcherzyk
Mała, otoczona pojedynczą błoną, kulista organella w cytoplazmie komórki eukariotycznej.

pęcherzyk sekrecyjny
Organella o pojedynczej błonie, w której są magazynowane przed sekrecją cząsteczki przeznaczone do wydzielenia. Nazywany czasem ziarnem sekrecyjnym z uwagi na optycznie gęsty wygląd tej organelli w mikroskopie.

pęcherzyk synaptyczny
Mały pęcherzyk błonowy wewnątrz zakończenia komórki nerwowej w synapsie (elementu presynaptycznego), wypełniony przekaźnikiem nerwowym. Pęcherzyki synaptyczne uwalniają swoją zawartość w drodze egzocytozy po dotarciu impulsu nerwowego (potencjału czynnościowego) do zakończenia nerwu.

pęcherzyki transportujące
Pęcherzyki błonowe przenoszące białka z jednego przedziału komórki do drugiego, np. z ER do aparatu Golgiego.

pH skala
Powszechnie stosowana miara stopnia zakwaszenia roztworu. Zdefiniowana jako ujemny logarytm stężenia jonów wodoru wyrażonego w molach na litr (M). Tak więc kwaśny roztwór o pH 3 ma stężenie jonów wodoru 10^{-3} M.

pierwiastek
Substancja, której nie można już rozłożyć do jakiejkolwiek innej formy chemicznej; złożona z jednego tylko typu atomów.

pierwotniak
Przedstawiciel *Protozoa*. Swobodnie żyjący, nie fotosyntetyzujący, jednokomórkowy, ruchliwy organizm eukariotyczny. Większość pierwotniaków, np. *Paramecium* lub *Amoeba*, żyje jako drapieżcy lub pasożyty.

pierwotny transkrypt — *patrz* **transkrypcja**

pinocytoza
Pobieranie przez komórkę płynu w drodze endocytozy (gr. pinein — pić).

pirymidyna
Jeden z dwóch rodzajów związków pierścieniowych zawierających azot, występujący w DNA i RNA. Przykładami są cytozyna, tymina i uracyl (*Patrz* panel 2-6, s. 66).

plazmid
Mała kolista cząsteczka DNA, replikująca niezależnie od genomu. Powszechnie używana jako wektor do klonowania DNA.

plazmodesmy
Połączenia między komórkami roślinnymi, w których kanał cytoplazmy wyścielony błoną komórkową łączy dwie przylegające do siebie komórki poprzez mały otwór w ich ścianach komórkowych.

plemnik
Gameta męska, zazwyczaj mała i silnie ruchliwa, wytwarzana w dużych ilościach.

podjednostka
Grupa chemiczna lub cząsteczka tworząca część dużej cząsteczki; monomer. Na przykład wiele białek jest kompleksami złożonymi z licznych łańcuchów polipeptydowych utrzymywanych razem wiązaniami niekowalencyjnymi. Każdy składowy łańcuch polipeptydowy jest podjednostką białka.

podłoże
Stała powierzchnia, do której przywierają komórki.

podstawny
Usytuowany przy podstawie. Podstawna powierzchnia komórki znajduje się po stronie przeciwnej niż jej powierzchnia szczytowa (wierzchołkowa).

podział komórki
Rozdzielenie komórki na dwie komórki potomne. W komórkach eukariotycznych obejmuje podział jądra (mitozę) i podział cytoplazmy (cytokinezę).

polarność (polarna)
Dotyczy cząsteczki lub kowalencyjnego wiązania w cząsteczce, w którym elektrony wiązania są silniej przyciągane przez pewne atomy niż przez inne, co powoduje nierównomierne (lub spolaryzowane) rozmieszczenie ładunku elektrycznego.

polimer
Długa i zazwyczaj liniowa cząsteczka powstała przez połączenie w powtarzający się sposób wielu identycznych lub podobnych jednostek (monomerów).

polimeraza
Ogólna nazwa enzymu katalizującego dodanie kolejnej jednostki do polimeru. Na przykład polimeraza DNA wytwarza DNA, a polimeraza RNA wytwarza RNA.

polimeraza RNA
Enzym, który na matrycy DNA katalizuje syntezę cząsteczki RNA z prekursorów — trifosforanów nukleozydów.

polinukleotyd
Molekularny łańcuch nukleotydów powiązanych chemicznie serią wiązań fosfodiestrowych. RNA lub DNA.

polipeptyd
Liniowy polimer zbudowany z dużej liczby aminokwasów. Białka są dużymi polipeptydami i obie te nazwy można używać zamiennie.

polipeptydowy łańcuch
Liniowy łańcuch atomów zawierający powtarzające się wią-

zania peptydowe, który przebiega wzdłuż cząsteczki białka i z którego wystają boczne łańcuchy aminokwasów.

polisacharyd
Liniowy lub rozgałęziony polimer zbudowany z cukrów. Przykładami są glikogen, kwas hialuronowy i celuloza.

połączenie komórkowe
Specjalny region (obszar) łączący dwie komórki ze sobą lub komórkę z substancją międzykomórkową.

połączenie komunikacyjne (ang. gap junction)
Połączenie łączące dwie komórki, które umożliwia przechodzenie jonów i małych cząsteczek z cytoplazmy jednej komórki do cytoplazmy komórki sąsiedniej.

połączenie zamykające (ang. tight junction)
Złączenie zlepiające dwie sąsiadujące komórki nabłonkowe, zapobiegające przechodzeniu cząsteczek rozpuszczonych w płynie międzykomórkowym z jednej strony warstwy nabłonka na drugą.

połączenie zwierające
Połączenie między komórkami, w którym cytoplazmatyczna strona błony komórkowej tworzącej to połączenie jest związana z aktynowymi filamentami (mikrofilamentami).

pompa
Białko transbłonowe napędzające aktywny transport jonów przez dwuwarstwę lipidową.

pompa sodowa (pompa Na^+-K^+; Na^+-K^+ ATPaza)
Transbłonowe białko występujące w błonie komórkowej większości komórek zwierzęcych, które wypompowuje z komórki Na^+, a wprowadza do niej K^+, używając w tym celu energii pochodzącej z hydrolizy ATP.

por jądrowy
Kanał przechodzący przez otoczkę jądrową, umożliwiający przemieszczanie się wybranych cząsteczek między wnętrzem jądra a cytoplazmą.

poruszanie się komórki (migracja, lokomocja)
Aktywne przemieszczanie się komórki z jednego miejsca do drugiego. W szczególności przemieszczanie się komórki na stałej powierzchni.

potencjał czynnościowy
Szybki, przejściowy, samorozprowadzający się sygnał elektryczny w błonie komórkowej komórek nerwowych i mięśniowych. Impuls nerwowy.

potencjał oksydoredukcyjny
Miara tendencji danego układu do oddawania elektronów (działania jako czynnik redukujący) lub przyjmowania elektronów (działania jako czynnik utleniający).

profaza
Pierwsze stadium mitozy, w którym chromosomy ulegają kondensacji, ale jeszcze nie są przyczepione do wrzeciona mitotycznego. Również: podobne stadium w mejozie.

programowana śmierć komórki (apoptoza)
Uzależniony od ekspresji genów proces samobójstwa komórki, podczas którego komórka obkurcza się, rozpada się na ciałka apoptotyczne, które zostają usunięte przez sąsiednie komórki.

prokariota
Typ żywych komórek charakteryzujący się brakiem wyróżnionego jądra. Bakterie.

prometafaza
Stadium mitozy poprzedzające metafazę.

promotor
Sekwencja nukleotydów w DNA, do której wiąże się polimeraza RNA, aby rozpocząć transkrypcję.

proteosom

Duży kompleks białkowy w cytozolu, odpowiedzialny za rozkład białek cytozolowych, które zostały oznakowane — przez ubikwitynację lub w inny sposób — do zniszczenia.

proteaza (proteinaza, enzym proteolityczny)
Enzym, który rozkłada białka na drodze hydrolizy niektórych ich wiązań peptydowych; na przykład trypsyna.

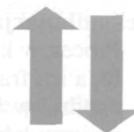
proteina — *patrz* **białko**

proteoliza
Rozkład białka za pomocą proteaz.

proton
Cząstka o ładunku dodatnim występująca w jądrze atomu; jądro atomu wodoru. Występuje również niezależnie jako dodatnio naładowany jon wodorowy (H^+).

protoonkogen — *patrz* **onkogen**

przeciwciało (immunoglobulina)
Białko wytwarzane przez limfocyty B w odpowiedzi na obcą cząsteczkę lub na organizm, który dokonał inwazji. Wiąże się ściśle z obcą cząsteczką lub komórką, przez co inaktywuje ją lub oznakowuje do zniszczenia.

przeciwrównoległe

Ułożone równolegle, ale o przeciwnym zwrocie; przykładem są dwie nici helisy DNA.

przekaźnik nerwowy (neuromediator)
Mała cząsteczka sygnałowa wydzielana przez komórkę nerwową w synapsie chemicznej jako sygnał dla komórki postsynaptycznej. Przykładami są: acetylocholina, GABA (kwas γ-aminomasłowy), glutaminian i glicyna.

przekształcanie sygnału
Zamiana jednej formy sygnału, chemicznej lub fizycznej, na inną, w dowolnej kombinacji. W biologii komórki proces, którym komórka doprowadza do odpowiedzi na sygnał zewnątrzkomórkowy.

przenośnik
Błonowe białko transportujące, wiążące substancję rozpuszczoną w wodzie i przenoszące ją poprzez błonę, przy czym samo ulega serii zmian konformacyjnych.

pseudopodium (nibynóżka)
Duża wypustka powierzchni komórki tworzona przez pełznące komórki pełzakowate. Bardziej ogólnie, jakakolwiek wysunięta część powierzchni komórki zwierzęcej, bogata w dynamiczną aktynę (gr. „fałszywa stopa").

punkt kontrolny (punkt restrykcyjny)
Moment w cyklu podziałowym komórki eukariotycznej, w którym przebieg cyklu może zostać wstrzymany aż do chwili, gdy komórka będzie zdolna do przejścia do następnego etapu.

puryna
Jeden z dwóch rodzajów związków pierścieniowych zawierających azot, występujący w DNA i RNA. Przykładem są adenina i guanina. (*Patrz* panel 2-6, s. 66).

ramka odczytu
Sposób wyboru, jak podzielić sekwencję nukleotydów na kolejne trójki kodowe, które mają być odczytane jako kodony podczas translacji. Sekwencja nukleotydów może być czytana w jakiejkolwiek z trzech ramek odczytu w zależności od punktu startu.

reakcja oksydoredukcyjna (oksydoredukcja, reakcja redoks, reakcja utleniania i redukcji)
Reakcja, w której elektrony są przenoszone z jednego atomu lub cząsteczki na drugi atom lub cząsteczkę.

reakcja sprzężona
Związana ze sobą para reakcji chemicznych, w których energia swobodna uwolniona w jednej reakcji służy do zasilenia drugiej reakcji.

receptor
Białko wykrywające bodziec — którym najczęściej jest zmiana stężenia specyficznej cząsteczki sygnałowej — a następnie zapoczątkowujące odpowiedź komórki. Receptory są umieszczone szczególnie licznie w błonie komórkowej, gdzie oddziałują z hormonami, przekaźnikami nerwowymi i innymi cząsteczkami znajdującymi się w środowisku pozakomórkowym.

redukcja
Dodanie elektronów do atomu, tak jak zachodzi to podczas dodania wodoru do cząsteczki, lub usunięcie tlenu z cząsteczki. Odwrotność utleniania. (*Patrz* rys. 3-11).

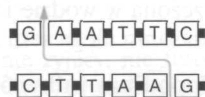
rekombinacja
Proces, w którym chromosomy lub cząsteczki DNA są cięte, a ich fragmenty łączone w nowe kombinacje. Może zachodzić w komórce, np. w drodze crossing-over podczas mejozy, lub w probówce, z użyciem oczyszczonego DNA i enzymów, które tną i łączą nici DNA.

rekombinacyjna technologia DNA — *patrz* **inżynieria genetyczna**

replikacji początek
Miejsce na chromosomie bakteryjnym, wirusowym lub eukariotycznym, od którego rozpoczyna się replikacja DNA.

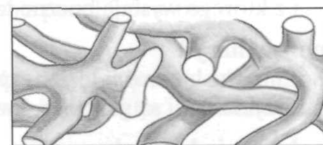
represor
Białko, które wiąże się ze specyficznym regionem DNA w celu zapobiegnięcia transkrypcji przyległego genu.

restrykcyjny enzym (nukleaza restrykcyjna)
Nukleaza rozpoznająca specyficzną krótką sekwencję nukleotydów w DNA rozcinająca DNA wszędzie tam, gdzie ta sekwencja występuje; różne enzymy restrykcyjne rozpoznają różne sekwencje nukleotydów. Często stosowane w rekombinacyjnej technologii DNA.



retikulum endoplazmatyczne (ER, siateczka śródplazmatyczna)
Przedział błonowy w cytoplazmie komórek eukariotycznych, tworzący rodzaj labiryntu, w którym wbudowywane są w błony białka oraz lipidy i do wnętrza którego wprowadzane są z cytoplazmy białka przeznaczone do sekrecji.

retikulum endoplazmatyczne gładkie
Część retikulum endoplazmatycznego, do którego nie przyłączają się rybosomy; bierze udział w syntezie lipidów.



retikulum endoplazmatyczne szorstkie
Część retikulum endoplazmatycznego, do którego przyłączają się rybosomy; bierze udział w syntezie białek błonowych i sekrecyjnych.

retrowirus
Wirus zawierający RNA, który namnaża się przez wejście do komórki gospodarza, skopiowanie przez odwrotną transkrypcję swego własnego genomu RNA jako cząsteczki DNA oraz przez zintegrowanie tego DNA z genomem komórki gospodarza. Następnie zintegrowany wirusowy DNA kieruje syntezą licznych cząsteczek nowego wirusowego RNA, z którego powstają nowe cząstki wirusa.

RNA (kwas rybonukleinowy)
Polimer utworzony z kowalencyjnie związanych rybonukleotydów.

RNA splicing — *patrz* **splicing RNA**

RNA starterowy
Krótki odcinek RNA utworzony na nici opóźnionej podczas replikacji DNA, a następnie usuwany.

rozpoznawanie molekularne
Wybiórcze związanie jednej cząsteczki z drugą przez dopasowania cech komplementarnych. Na przykład enzym rozpoznaje swój substrat, a przeciwciało rozpoznaje swój antygen.

rozwój
Kolejne zmiany prowadzące od zapłodnionej komórki jajowej do powstania wielokomórkowej rośliny lub zwierzęcia.

równowaga
W znaczeniu chemicznym — stan, w którym reakcje w kierunku wprost i odwrotnym przebiegają z równą szybkością, przez co nie zachodzi żadna zmiana chemiczna netto.

różnicowanie
Proces, w którym komórka ulega zmianie wywołującej specjalizację, wyróżniającą później tę komórkę.

rybosom
Cząstka złożona z rybosomowych RNA i rybosomowych białek, która łączy się z informacyjnym RNA i katalizuje syntezę białka.



rybosomowy RNA (rRNA)
Każdy z kilku specyficznych rodzajów RNA stanowiących część struktury rybosomu i uczestniczących w syntezie białek.

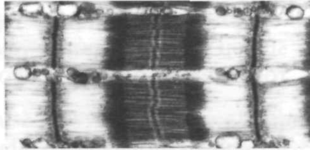
rybozym
Cząsteczka RNA o właściwościach katalitycznych względem RNA.

rzęska
Wypustka o kształcie włosa na powierzchni komórki, wypełniony rdzenną wiązką mikrotubul i zdolna do wykonania ruchów określanych jako ruch rzęskowy. Na powierzch-

ni warstw nabłonkowych rzęski — występujące w dużych ilościach — powodują ruch płynu, jak dzieje się np. w oskrzelach.

sacharyd
Używany jako końcówka nazwy cukrowca określającej jego strukturę, np. disacharyd (dwucukier, zbudowany z dwóch cząsteczek cukrów prostych) lub polisacharyd (wielocukier).

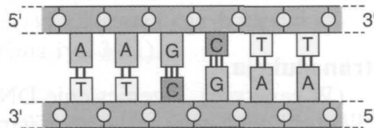
sarkomer
Powtarzająca się jednostka włókienka mięśniowego (miofibryli) w komórkach mięśniowych, o długości ok. 2,5 μm zbudowana z układu nachodzących na siebie filamentów grubych (miozyna) i cienkich (aktyna).



sekrecja (wydzielanie)
Wytwarzanie w komórce substancji i późniejsze jej wydzielanie z komórki.

sekwencja
Liniowa kolejność podjednostek w łańcuchu polimeru — na przykład aminokwasów w białku lub nukleotydów w DNA. W zasadzie sekwencja w danej makrocząsteczce określa jej szczególną funkcję biologiczną.

sekwencja palindromowa
Sekwencja nukleotydów identyczna do nici komplementarnej, gdy obie nici są czytane w tym samym chemicznie kierunku (czyli 5′→ 3′).



sekwencja sygnałowa
Sekwencja aminokwasów kierująca białko do specyficznego miejsca w komórce, takiego jak jądro, mitochondria lub retikulum endoplazmatyczne.

sekwencja wzmacniająca
Regulatorowa sekwencja DNA, do której wiążą się regulatorowe białka genów. Ma ona wpływ na szybkość transkrypcji genów struktury, które mogą być oddalone o wiele tysięcy par zasad.

siateczka graniczna
Wyspecjalizowana obwodowa warstwa cytoplazmy przylegająca do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. W komórkach zwierzęcych zawiera dużo włókien aktynowych, odpowiedzialnych za powierzchniowe ruchy komórki.

sieć *cis* Golgiego (CGN)
Ta część aparatu Golgiego, która jest położona najbliżej retikulum endoplazmatycznego.

sieć *trans* Golgiego (TGN)
Ta część aparatu Golgiego, która jest położona najdalej od retikulum endoplazmatycznego. Z sieci tej wywodzą się białka i lipidy przeznaczone do lizosomów, pęcherzyków sekrecyjnych lub powierzchni komórki.



skrobia
Polisacharyd zbudowany wyłącznie z podjednostek glukozy, służący w komórkach roślin jako magazyn energii.

SNARE
Jedno z rodziny białek błonowych odpowiedzialnych za selektywną fuzję pęcherzyków z odpowiednimi błonami docelowymi.

sonic hedgehog („dźwiękowy jeż")
Białko sygnałowe odpowiedzialne za organizowanie układu ważniejszych części ciała (odkrywcy wzięli tę nazwę z komiksów).

specyficzność molekularna
Wybiórcze powinowactwo jednej cząsteczki do drugiej, które umożliwia obu cząsteczkom wiązanie się lub reagowanie ze sobą nawet w obecności licznych cząsteczek innego typu.

splicing RNA (składanie RNA)
Proces wycinania z cząsteczek RNA sekwencji intronowych i łączenia eksonów zachodzący w jądrze podczas powstawania informacyjnego RNA.

stała równowagi (*K*)
Liczba (wielkość) określająca stan równowagi odwracalnej reakcji chemicznej; wyznaczana przez stosunek stałej charakteryzującej szybkość danej reakcji w kierunku wprost do stałej charakteryzującej szybkość tej reakcji w kierunku odwrotnym. (*Patrz* tab. 3-1, s. 92).

stan przejściowy
Struktura chemiczna, która tworzy się przejściowo w przebiegu reakcji i ma najwyższą energię swobodną spośród wszystkich intermediatów tej reakcji.

starzenie się komórki
Naturalne starzenie się komórek wyżej zorganizowanych zwierząt objawiające się tym, że po określonej liczbie podziałów w organizmie lub hodowli *in vitro* komórki przestają się dzielić i w końcu umierają.

steroidowy hormon
Lipofilowa cząsteczka hormonu o budowie podobnej do cholesterolu. Przykładami są estrogen i testosteron.

stroma
1. = **zrąb**. Tkanka łączna, w którą jest wbudowany nabłonek gruczołowy lub inny. 2. Przestrzeń wewnątrz otoczki plastydu (w tym chloroplastu) zawierająca enzymy, które w procesie fotosyntezy wbudowują CO_2 w cukry.

substancja międzykomórkowa — *patrz* **matriks międzykomórkowa**

substrat
Substancja, na którą działa enzym.

sulfhydrylowa grupa (—SH, *tiolowa, hydrosulfidowa*)
Grupa chemiczna zawierająca siarkę i wodór, występująca w aminokwasie cysteinie i innych cząsteczkach. Dwie grupy sulfhydrylowe (hydrosulfidowe) mogą się łączyć, wytwarzając wiązanie dihydrosulfidowe (dwusiarczkowe).

superhelisa
Niezwykle stabilna pałeczkowata struktura białka utworzona przez dwie α helisy owinięte wokół siebie.

supresorowy gen nowotworu
Gen, który działa w prawidłowej komórce tkanki w kierunku ograniczania proliferacji komórki lub jej inwazyjnego zachowania. Utrata lub inaktywacja w komórce diploidalnej obu kopii takiego genu powoduje utratę kontroli i ułatwia przejście komórki w postać nowotworową.

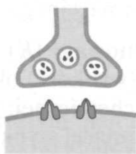
sygnalizacja międzykomórkowa
Komunikowanie się komórek ze sobą przez zewnątrzkomórkowe sygnały chemiczne; w szczególności, mechanizmy molekularne wykrywania sygnałów i odpowiadania na nie przez komórki.

sygnału przekształcanie — *patrz* **przekształcanie sygnału**

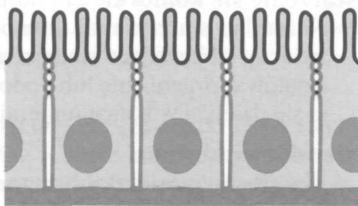
symbioza
Ścisły związek między dwoma organizmami należącymi do różnych gatunków, z którego oba organizmy czerpią długotrwałe, wybiórcze korzyści.

symport
Forma kotransportu, w którym przenośnik błonowy transportuje dwa rodzaje substancji poprzez błonę w tym samym kierunku.

synapsa
Wysoce wyspecjalizowane połączenie między komórkami nerwowymi, przez które komórki przekazują sygnał. W większości synaps sygnał jest przenoszony przez przekaźnik nerwowy, wydzielany z zakończenia komórki nerwowej pod wpływem impulsu nerwowego; przekaźnik ten dyfunduje do drugiej komórki. Połączenie komórki nerwowej z inną komórką docelową nazywamy np. połączeniem nerwowo-mięśniowym.

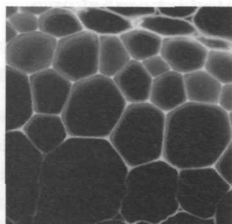


szczytowa (wierzchołkowa)
Usytuowana na szczycie (wierzchołku) komórki lub struktury albo organu. Szczytową powierzchnią komórki nabłonkowej (pokazaną tu w kolorze *czerwonym*) jest wolna powierzchnia, przeciwstawna do powierzchni podstawnej.



szlak metaboliczny
Sekwencja reakcji enzymatycznych, w których produkt jednej reakcji jest substratem reakcji następnej.

ściana komórkowa
Mechanicznie odporna, włóknista warstwa odłożona przez komórkę na zewnątrz jej błony komórkowej. Bardzo rozbudowana u większości roślin, bakterii, glonów i grzybów, ale nieobecna w większości komórek zwierzęcych.



światło
Przestrzeń zamknięta warstwą nabłonka (w tkance) lub błoną (w komórce) — na przykład światło retikulum endoplazmatycznego (łac. lumen — światło lub otwór).

TATA kaseta
Charakterystyczna sekwencja bogata w nukleotydy T i A, występująca w promotorowym regionie wielu genów eukariotycznych (i prokariotycznych), wyznaczająca miejsce rozpoczęcia transkrypcji.

telofaza
Końcowe stadium mitozy, w którym dwa garnitury oddzielonych chromosomów ulegają dekondensacji i zostają zamknięte w otoczkach jądrowych.

telomer
Struktura na końcu chromosomu związana z charakterystyczną sekwencją DNA, która replikuje się w specjalny sposób (gr. telos — koniec, meros — część).

tkanka
Zorganizowany zespół wyspecjalizowanych komórek i substancji międzykomórkowej, wchodzący w skład organizmu roślinnego lub zwierzęcego.

tlenek azotu (NO)
Cząsteczka gazu działająca jak sygnał międzykomórkowy. Powstaje w komórkach z argininy działaniem syntazy tlenku azotu (NOS) pod wpływem sygnału. Dyfundując do sąsiadujących komórek powoduje m. in. relaksacje mięśni gładkich i uaktywnia element presynaptyczny, ułatwiając egzocytozę przekaźnika nerwowego.

tłuszcz
Lipidy, których żywe komórki używają do magazynowania energii metabolicznej. Zbudowany głównie z triacylgliceroli. (*Patrz* panel 2-4, s. 58–59).

trans
Za lub po drugiej stronie.

transdukcja
(W genetyce). Przeniesienie DNA gospodarza z jednej komórki do drugiej za pomocą wirusa.

transformacja
Proces, w którym komórki pobierają ze swego otoczenia cząsteczki DNA i następnie doprowadzają do ekspresji genów zawartych w tym DNA.

transgeniczny
(O roślinach lub zwierzętach). Mający, w formie wbudowanej na stałe, jeden lub więcej genów pochodzących z innej komórki lub organizmu i zdolny do przeniesienia tych genów na następne pokolenia.

transkrypcja
Przekopiowanie jednej nici DNA na komplementarną sekwencję RNA, dokonywane przez enzym — polimerazę RNA.

translacja
Proces, w którym sekwencja nukleotydów zawarta w cząsteczce informacyjnego RNA kieruje wbudowywaniem aminokwasów w białka; zachodzi na rybosomie.

transport aktywny
Przemieszczanie cząsteczki poprzez błonę, zasilane przez hydrolizę ATP lub inną formę energii metabolicznej.

transport bierny
Przemieszczanie się małej cząsteczki lub jonu poprzez błonę, zasilane różnicą stężenia lub potencjału elektrycznego.

transport sprzężony
Transport błonowy, w którym przeniesienie jednej cząsteczki jest uzależnione od jednoczesnego lub następującego tuż po tym przeniesienia dalszej cząsteczki.

transportujący RNA (tRNA)
Mała cząsteczka RNA działająca w syntezie białka jako adaptor między specyficznym kodonem lub zestawem kodonów na mRNA a aminokwasem. Każdy typ cząsteczki tRNA jest kowalencyjnie związany z określonym aminokwasem i przez parowanie zasad rozpoznaje określony kodon lub zestaw kodonów.

transpozon
Segment DNA, który może się przemieszczać w chromosomie z jednego miejsca na drugie lub z jednego chromosomu do drugiego w tej samej komórce. Ważne źródło genetycznej zmienności u większości organizmów.

triacyloglicerol
Ester glicerolu i kwasów tłuszczowych; główny składnik kropli tłuszczu w tkankach zwierzęcych (gdzie kwasy tłuszczowe są nasycone) i olejów roślinnych (gdzie kwasy tłuszczowe są przeważnie nienasycone).

tubulina
Białko, z którego są zbudowane mikrotubule.

typ dziki
Normalna niezmutowana forma gatunku utrzymywana w hodowli prowadzonej w warunkach naturalnych. Określenie to jest używane też w odniesieniu do niezmutowanej linii komórkowej, genu i białka.

utlenianie
Utrata przez atom elektronu(ów) następująca w wyniku dodania tlenu do cząsteczki lub usunięcia z niej wodoru. Odwrotność redukcji. (*Patrz* rys. 3-11).

V_{max}
Maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej, osiągana natychmiast po dodaniu substratu w stężeniu wysycającym.

van der Waalsa siła
Słaba siła przyciągania wynikająca z fluktuacji ładunków elektrycznych, która działa między dwoma atomami oddalonymi od siebie o 0,3–0,4 nm. Przy bliższych odległościach zaczynają działać znaczne siły odpychania.

wektor
(W genetyce molekularnej). Element genetyczny, zazwyczaj bakteriofag lub plazmid, który może włączyć w siebie fragment obcego DNA i przenieść go do komórki przyjmującej. Często stosowany w klonowaniu genów.

węglowodany — *patrz* **cukrowce**

wiązania długość
Odległość między dwoma atomami połączonymi specyficznym wiązaniem chemicznym (zazwyczaj wiązaniem kowalencyjnym).

wiązania energia
Siła wiązania chemicznego między dwoma atomami, mierzona ilością energii potrzebnej do jego rozszczepienia, wyrażanej w kilodżulach/mol.

wiązanie chemiczne
Wiązanie między dwoma atomami, utrzymujące je razem w związku chemicznym. W żywych komórkach występują następujące typy wiązań: jonowe, kowalencyjne, polarne i wodorowe.

wiązanie dihydrosulfidowe — *patrz* **dwusiarczkowe wiązanie**

wiązanie fosfodiestrowe
Kowalencyjne wiązanie chemiczne powstające podczas estrowego łączenia dwóch grup hydroksylowych z tą samą grupą fosforanową, jak w przypadku sąsiadujących ze sobą nukleotydów w cząsteczce RNA lub DNA. (*Patrz* panel 2-6, s. 67).

wiązanie jonowe
Siły wiążące, które utrzymują razem dwa jony; jeden dodatni, a drugi ujemny.

wiązanie kowalencyjne
Stabilne wiązanie chemiczne między dwoma atomami wynikające ze wspólnego użytkowania jednej lub więcej par elektronów.

wiązanie niekowalencyjne
Wiązanie chemiczne, w którym nie ma wspólnego wykorzystania elektronów (obecnego w wiązaniu kowalencyjnym). Wiązania niekowalencyjne są względnie słabe, lecz mogą się sumować, powodując silne i wysoce specyficzne oddziaływania między cząsteczkami.

wiązanie peptydowe
Wiązanie chemiczne między grupą karbonylową jednego aminokwasu i grupą aminową drugiego aminokwasu — specjalna forma wiązania amidowego. (*Patrz* panel 2-5, s. 62).

wiązanie podwójne
Typ wiązania chemicznego między dwoma atomami, powstaje przez wspólne wykorzystanie czterech elektronów.

wiązanie tioestrowe
Wiązanie o wysokiej energii utworzone w reakcji kondensacji między grupą kwasową (acylową) a grupą tiolową (hydrosulfidową, —SH); występuje na przykład w acetylo-CoA i w wielu kompleksach enzym–substrat.

wiązanie węgla — *patrz* **asymilacja węgla**

wiązanie wodorowe
Słabe wiązanie chemiczne między atomem elektroujemnym, takim jak azot lub tlen, a atomem wodoru związanym z innym atomem elektroujemnym.



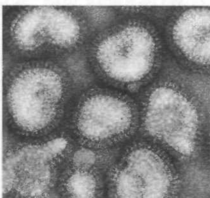
wiązanie „wysokoenergetyczne"
Wiązanie kowalencyjne, którego hydroliza w warunkach istniejących w komórce uwalnia niezwykle dużą ilość energii swobodnej. Przykładami są wiązania bezwodnikowe w ATP i wiązania tioestrowe w acetylo-CoA.

wić
Długa wypustka o kształcie bicza, której ruch uderzający umożliwia przemieszczanie się komórki w środowisku płynnym. U eukariota wici są dłuższą wersją rzęsek; u bakterii wici są całkowicie odmienne, mniejsze i o prostszej budowie.



widełki replikacyjne
Region replikującej się cząsteczki DNA o kształcie litery Y, w którym dwie rodzicielskie nici rozdzielają się i w którym są syntetyzowane dwie nowe nici potomne.

wirus



Zakaźna cząstka zbudowana z kwasu nukleinowego (RNA lub DNA) zamknięta w kapsydzie; replikuje się pasożytując na mechanizmie reprodukcyjnym komórki gospodarza, z której są uwalniane nowe cząstki wirusa, infekujące inne komórki. Częsta przyczyna chorób.

wodorowy jon (H^+) — *patrz* **jon wodorowy**

wtórna cząsteczka informacyjna

Mała cząsteczka wytworzona w komórce (lub uwolniona do cytozolu) w odpowiedzi na sygnał zewnątrzkomórkowy. Wiąże ona ten sygnał z wnętrzem komórki. Przykładami są: cAMP, IP_3 oraz Ca^{2+}.

zakończenie nerwu

Zakończenie aksonu, z którego jest wysyłany sygnał do komórki lub komórek docelowych, zazwyczaj w obrębie synapsy.

zasada

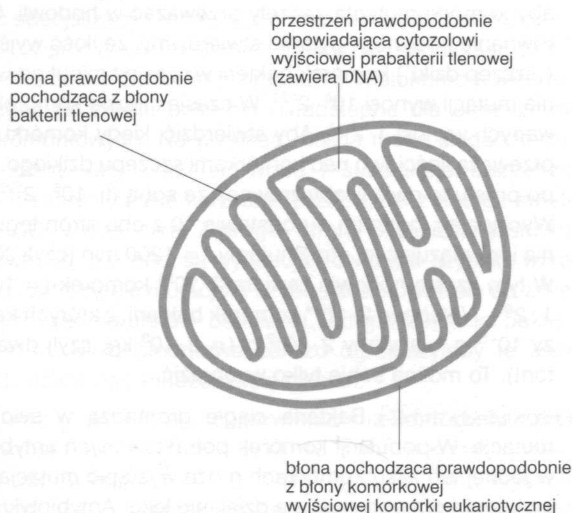
Cząsteczka przyjmująca proton w roztworze. Nazwą tą określa się również puryny i pirymidyny w DNA i RNA.

zrąb — *patrz* **stroma**

Odpowiedzi na pytania

Rozdział 1

Odpowiedź 1-1. Patrz rys. O1-1



Rys. O1-1

Odpowiedź 1-2. Przez fizyczne wciągnięcie substancji takich jak cząstki pokarmowe, komórki eukariotyczne mogą je wchłaniać i bez przeszkód wykorzystać jako pokarm. Natomiast bakterie nie potrafią wyłapywać kawałków pokarmu; mogą natomiast wydzielać substancje rozkładające pokarm w otoczeniu, ale wówczas efektem swej pracy muszą dzielić się z innymi sąsiadującymi komórkami.

Odpowiedź 1-3. Mikroskop świetlny jest znacznie łatwiejszy w użyciu i wymaga prostszego osprzętowania. Obiekty o wymiarze 1 μm można łatwo rozróżnić; dolną granicą rozdzielczości jest 0,2 μm, co odpowiada granicy teoretycznej, narzuconej długością fali światła widzialnego. Światło widzialne nie działa destrukcyjnie i z łatwością przechodzi przez wodę, co umożliwia obserwację żywych komórek. Z drugiej strony, mikroskopia elektronowa jest dużo bardziej skomplikowana zarówno z uwagi na aparat, jak i przygotowanie próbek, które muszą być skrawane niezwykle cienko, barwione elektronowo gęstym metalem ciężkim i całkowicie odwodnione. Komórek nie można obserwować przyżyciowo. Natomiast rozdzielczość w mikroskopii elektronowej jest znacznie większa i można łatwo rozróżnić bardzo małe obiekty o wymiarze 10 nm. Aby więc zobaczyć szczegóły strukturalne — mikrotubule, mitochondria i bakterie, należy posłużyć się mikroskopią elektronową. Można jednak również wybarwić te struktury specyficznymi barwnikami, a potem określić ich umiejscowienie w komórce za pomocą mikroskopu świetlnego.

Odpowiedź 1-4. Większość przypadkowych zmian dotyczących modelowania buta prowadziłaby do zniekształceń zmniejszających jego użyteczność. Buty o wielu obcasach, bez podeszwy lub o dziwacznych kształtach trudno byłoby sprzedać i zostałyby one wyeliminowane przez mechanizmy rynkowe. Inne zmiany, takie jak drobne różnice w kolorze lub wielkości mogłyby być neutralne. Jednak tylko rzadko zmiana może poprawić jakość buta; np. głębokie nacięcia na poprzednio płaskiej podeszwie spowodują lepsze zachowanie się buta na śliskiej powierzchni, a obniżenie wysokich obcasów spowoduje, że buty staną się wygodniejsze. Ten przykład ilustruje regułę, że zmiany przypadkowe mogą prowadzić do istotnych ulepszeń, pod warunkiem, że liczba prób jest dostatecznie duża oraz że zadziała presja selekcyjna.

Odpowiedź 1-5. Dopiero $6 \cdot 10^{39}$ ($= 6 \cdot 10^{27}$g/ 10^{-12} g) bakterii miałoby masę równą masie Ziemi. Według równania opisującego wzrost wykładniczy $6 \cdot 10^{39} = 2^{t/20}$; rozwiązując to równanie otrzymujemy t = 2642 min (lub 44 godziny). Stanowi to tylko 132-krotność czasu generacji (!), podczas gdy w ciągu ostatnich 3,5 miliardów lat minęło $5 \cdot 10^{14}$ czasów generacji. Oczywiście nigdy całkowita masa bakterii nie osiągnęła masy Ziemi. Stanowi to ilustrację faktu, że wzrost wykładniczy może trwać tylko przez kilka pokoleń, tj. czas nieskończenie mały w porównaniu z ewolucją. W warunkach realnych bardzo szybko dostępność pokarmu staje się czynnikiem ograniczającym.

To proste obliczenie pokazuje, że zdolność do szybkiego wzrostu i podziału w warunkach obfitości pokarmu jest tylko jednym z czynników przeżywania gatunku. Pokarmu jest w zasadzie niewiele i główną przewagę we współzawodnictwie

będą często miały te komórki, które okażą największą zdolność adaptacji do zmieniających się warunków otoczenia i w których pojawiły się bardziej skomplikowane systemy, pozwalające użytkować różne źródła pokarmu.

Odpowiedź 1-6. Dwa odmienne powiązania ewolucyjne można podsumować następująco:

forma wyjściowa wszystkich komórek → *Giardia* → eukariota

forma wyjściowa wszystkich komórek → eukariota → *Giardia*

Aby wybrać jedną z tych możliwości, należałoby wiedzieć, jak blisko spokrewnione są *Giardia* i prokariota. Można się o tym przekonać badając na przykład poziom podobieństwa ich białek lub kwasów nukleinowych. Takie podejście wykazuje, że *Giardia* w obrębie drzewa ewolucyjnego jest równie daleka od innych eukariota jak od prokariota, co popiera model pierwszy.

Odpowiedź 1-7. Ponieważ podstawy działania komórek są bardzo podobne, dużo można dowiedzieć się z badania systemów modelowych. Drożdże piekarskie są dobrym modelem dlatego, że komórki drożdży są znacznie prostsze od nowotworowych komórek człowieka. Drożdże możemy hodować niedrogo i w dużych ilościach, a ich komórkami możemy manipulować genetycznie i biochemicznie znacznie łatwiej niż komórkami ludzkimi. To pozwala nam na wyciąganie wniosków o podstawowych regułach rządzących podziałem i wzrostem komórek. Komórki nowotworowe dzielą się wtedy, kiedy nie powinny, powodując wzrost guzów i dlatego zrozumienie, w jaki sposób komórki kontrolują swój wzrost, ma istotny związek z problemem nowotworów. Dlatego też główne instytuty i towarzystwa naukowe na świecie prowadzące badania nad nowotworami, aby znaleźć sposób ich leczenia, silnie rozwijają podstawowe badania nad różnymi aspektami podziału komórki w różnych systemach modelowych, w tym drożdży.

Odpowiedź 1-8. Sprawdź swoje odpowiedzi posługując się Słowniczkiem i panelem 1-2 (s. 18).

Odpowiedź 1-9

A. Nieprawdziwe. Informacja dziedziczna zakodowana jest w komórkowym DNA, który z kolei koduje białka komórki.

B. Prawdziwe. Bakterie nie mają jądra.

C. Nieprawdziwe. Rośliny składają się z komórek eukariotycznych zawierających chloroplasty jako organelle cytoplazmatyczne. Uważa się, że chloroplasty pochodzą ewolucyjnie od komórek prokariotycznych.

D. Prawdziwe. Liczba chromosomów różni jeden organizm do drugiego, ale jest stała dla wszystkich komórek tego samego organizmu.

E. Nieprawdziwe. Cytozol jest cytoplazmą pozostałą po wykluczeniu wszystkich organelli.

F. Prawdziwe. Otoczka jądrowa jest błoną podwójną, a mitochondria otoczone są przez dwie błony: wewnętrzną i zewnętrzną.

G. Nieprawdziwe. Pierwotniaki są organizmami jednokomórkowymi, więc nie mają różnych tkanek; mają natomiast złożoną budowę o wielu wyspecjalizowanych strukturach.

H. Częściowo prawdziwe. Peroksysomy i lizosomy zawierają enzymy katalizujące rozkład substancji wytworzonych w cytozolu lub pobranych przez komórkę. Można jednak uznać, że wiele z tych substancji jest rozkładanych do cząsteczek pokarmowych, a więc nie są to substancje niepożądane.

Odpowiedź 1-10. Przeciętna komórka mózgu waży 10^{-8} g (a więc na 1000 g mózgu składa się 10^{11} komórek). Ponieważ 1 g wody ma objętość 1 ml = 1 cm^3 (= 10^{-6} m^3), objętość jednej komórki wynosi 10^{-14} m^3 (= 10^{-8} g $\cdot$ 10^{-6} m^3/g). Wyciągnięcie pierwiastka trzeciego stopnia daje wymiar krawędzi każdej komórki: $2{,}1 \cdot 10^{-5}$ m, czyli 21 μm (10^6 μm = 1 m). Strona tej książki ma powierzchnię 0,057 m^2 (= 21 cm · 27,5 cm), a powierzchnia każdej komórki wynosi $441 \cdot 10^{-12}$ m^2 (= $2{,}1 \cdot 10^{-5}$ m. · $\cdot 2{,}1 \cdot 10^{-5}$ m). Stąd pojedyncza warstwa komórek rozpostarta na tej stronie będzie liczyła $129 \cdot 10^6$ komórek (= 0,057 m^2/ $/441 \cdot 10^{-12}$ m^2). Tak więc 10^{11} komórek zajęłoby 775 stron (= $10^{11}/ 129 \cdot 10^6$).

Odpowiedź 1-11. W tej komórce roślinnej A jest jądrem, B — wakuolą, C — ścianą komórki, a D — chloroplastem. Odcinek skali odpowiada ok. 10 μm, zarazem średnicy jądra.

Odpowiedź 1-12. Trzema głównymi typami włókien są filamenty aktynowe, filamenty pośrednie i mikrotubule. Filamenty aktynowe biorą udział w szybkich ruchach komórki, takich jak skurcz mięśnia. Filamenty pośrednie zapewniają stabilność mechaniczną, a mikrotubule działają jak „tory kolejowe" dla ruchów wewnątrzkomórkowych oraz są odpowiedzialne za rozdzielanie chromosomów podczas podziału komórki. Inne funkcje wszystkich tych filamentów omówiono w rozdz. 16.

Odpowiedź 1-13. Potrzeba tylko 20 godzin, tj. mniej niż dobę, aby komórki mutanta zaczęły przeważać w hodowli. Stosując równanie podane w pytaniu stwierdzimy, że ilość wyjściowych („szczep dziki") komórek bakterii w czasie *t* minut od wystąpienia mutacji wynosi $10^6 \cdot 2^{t/20}$. W czasie *t* liczba komórek zmutowanych wynosi $1 \cdot 2^{t/15}$. Aby stwierdzić, kiedy komórki mutanta przeważą ilościowo nad komórkami szczepu dzikiego, musimy po prostu te dwie liczby zrównać ze sobą (tj. $10^6 \cdot 2^{t/20} = 2^{t/15}$). Wyciągając logarytm o podstawie 10 z obu stron tego równania i rozwiązując je, otrzymujemy t = 1200 min (czyli 20 godz.). W tym czasie hodowla zawiera $2 \cdot 10^{24}$ komórek (= $10^6 \cdot 2^{60}$ + $1 \cdot 2^{80}$). *Notabene* $2 \cdot 10^{24}$ komórek bakterii, z których każda waży 10^{-12} g, ważyłoby $2 \cdot 10^{12}$ g (= $2 \cdot 10^9$ kg, czyli dwa miliony ton!). To można sobie tylko wyobrazić.

Odpowiedź 1-14. Bakterie ciągle gromadzą w swoim DNA mutacje. W populacji komórek potraktowanych antybiotykiem w jednej lub kilku komórkach może wystąpić mutacja nadająca komórkom oporność na działanie leku. Antybiotyki, których niszczące działanie na bakterię polega na wiązaniu się z pewnymi białkami bakteryjnymi, mogą na przykład nie działać, jeśli białka bakterii będą miały nieco zmienioną powierzchnię, przez co wiązanie będzie słabsze lub w ogóle nie wystąpi. Te mutanty bakterii będą nadal dzieliły się szybko, podczas gdy wzrost bakterii niezmutowanych zostanie spowolniony. Bakterie oporne na antybiotyk wkrótce staną się w hodowli rodzajem dominującym.

Odpowiedź 1-15. $10^{13} = 2^{t/1}$. Proces więc zajmie tylko 43 dni (t = 13 : log 2). To wyjaśnia, dlaczego pewne nowotwory mogą rozwijać się niezwykle szybko. Jednak wiele komórek nowotworowych rośnie znacznie wolniej lub umiera nie mając dostatecznego dopływu krwi i dlatego rzeczywisty postęp nowotworu jest zazwyczaj wolniejszy.

Odpowiedź 1-16. Żywe komórki powstały z materii nieożywionej, a jednak rosną i rozmnażają się. Podobnie jak materiał z którego powstały, podlegają prawom fizyki, termodynamiki

i chemii. Tak więc nie mogą na przykład tworzyć energii *de novo* lub wytworzyć uporządkowanych struktur bez wydatku energii. Możemy wytłumaczyć w zasadzie wszystkie procesy komórkowe takie jak metabolizm, katalizę, rozbudowę błon i replikację DNA jako skomplikowane reakcje chemiczne, które potrafimy odtworzyć i badać w probówce, kierując ich przebiegiem.

Pomimo takiego zasadniczego uproszczenia komórka żywa jest czymś więcej niż sumą swoich części. Nie możemy w sposób przypadkowy wymieszać białek, kwasów nukleinowych i innych składników chemicznych razem w probówce, licząc na otrzymanie komórki. Komórka działa bowiem właśnie dzięki swojej zorganizowanej strukturze, która jest wytworem historii ewolucyjnej. Komórki powstają zawsze z komórek uprzednio istniejących, a podział komórki macierzystej rozdziela do komórek potomnych zarówno składniki chemiczne jak i struktury. Na przykład błona komórkowa nigdy nie powstaje *de novo*, ale wyłącznie przez ekspansję już istniejącej błony. Zawsze istnieje rybosom częściowo złożony z białek, którego funkcją będzie wytworzenie dalszych białek, łącznie z tymi, które utworzą więcej rybosomów.

Odpowiedź 1-17. Komórki eukariotyczne nabrały większego stopnia skomplikowania kosztem zmniejszenia szybkości wzrostu. Ze względu na bardziej złożoną strukturę mogą one ulegać specjalizacji i wtedy różne komórki organizmu specjalizują się w pełnieniu określonych funkcji, współpracując ze sobą. Ze wzrostem złożoności organizmy wielokomórkowe mogą sięgać po źródła pokarmu niedostępne dla organizmów jednokomórkowych. Na przykład roślina może sięgać korzeniami gleby, aby pobierać wodę i substancje odżywcze, a w tym samym czasie korzystać przez liście z energii świetlnej i z CO_2 z powietrza. Z drugiej strony organizmy jednokomórkowe, np. bakterie, są wyspecjalizowane w szybkim wzroście i potrafią dzięki mutacjom szybko adaptować się do zmieniających się warunków otoczenia. Zorganizowanie bakterii w struktury wielokomórkowe bardzo ograniczyłoby tę zdolność do szybkiego mnożenia się i zmian.

Odpowiedź 1-18. Objętość i powierzchnia komórki bakteryjnej wynosi $5{,}24 \cdot 10^{-19}$ m^3 i $3{,}14 \cdot 10^{-12}$ m^2, a komórki zwierzęcej odpowiednio $1{,}77 \cdot 10^{-15}$ m^3 i $7{,}07 \cdot 10^{-10}$ m^2. Wyliczony z tych liczb stosunek powierzchni do objętości wynosi $6 \cdot 10^6$ m^{-1} dla bakterii, $4 \cdot 10^5$ m^{-1} dla komórek zwierzęcych. Innymi słowy, chociaż komórka zwierzęca zwiększyła w stosunku do bakterii swą objętość 3375 razy, powierzchnia jej błony wzrosła tylko 225-krotnie. Jeżeli jednak uwzględnimy w obliczeniach błony wewnątrzkomórkowe, to stosunki powierzchni do objętości będą u obu komórek prawie równe. Tak więc dzięki błonom wewnątrzkomórkowym komórki eukariotyczne mogą osiągnąć większe wymiary i ciągle utrzymywać dostatecznie dużą powierzchnię błon, która — jak omówimy to szczegółowo w późniejszych rozdziałach — jest niezbędna dla wielu istotnych funkcji. Jako przykład poznaliśmy już wewnętrzną błonę mitochondrialną; jest ona silnie sfałdowana ku środkowi dla zwiększenia powierzchni (patrz rys. 1-11). Błona ta jest bardzo ważna w tworzeniu ATP, nośnika energii, który napędza wiele reakcji komórkowych.

Odpowiedź 1-19. Wiele dowodów przemawia za wspólnym przodkiem. Analizy dziś żyjących komórek wykazały zdumiewający stopień podobieństwa podstawowych składników, decydujących o istocie działania komórek tak skądinąd bardzo różniących się. Na przykład wiele torów metabolicznych jest identycznych dla wielu typów komórek, a składniki budujące kwasy nukleinowe i białka są te same we wszystkich żywych komórkach, aczkolwiek można by sobie wyobrazić, że odmienny dobór składników (np. aminokwasów o odmiennych łańcuchach bocznych) działałby tak samo dobrze. Podobnie często stwierdza się, że ważne białka mają ścisłe podobieństwo szczegółów strukturalnych w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Teoretycznie są możliwe liczne różne drogi zbudowania białek, które mogłyby wykonywać te same funkcje. Ogromna ilość dowodów wskazuje, że najważniejsze procesy zostały „wynalezione" jedynie raz, a następnie tylko nieznacznie modyfikowane podczas ewolucji, aby sprostać szczególnym potrzebom wyspecjalizowanych komórek.

Jednakże wydaje się bardzo mało prawdopodobne, aby pierwsza komórka przeżyła i stała się protoplastą dzisiejszego świata żywego. Ponieważ ewolucja nie jest procesem kierowanym, o celowym postępie, wydaje się bardziej prawdopodobne, że wystąpiła duża liczba nieudanych komórek próbnych, które mnożyły się tylko chwilowo, a następnie wymierały, ponieważ nie mogły przystosować się do zmian w środowisku lub nie potrafiły przeżyć w konkurencji z innymi typami komórek. Możemy więc domniemywać, że prakomórką wyjściową została ta, której udało się natrafić na względnie stabilne środowisko, dające szansę mnożenia się i ewoluowania.

Rozdział 2

Odpowiedź 2-1

A. Liczba atomowa = 6, masa atomowa = 12 (6 protonów + + 6 neutronów).

B. 6 elektronów (ich liczba równa się liczbie protonów).

C. W powłoce najbliższej jądra mieszczą się 2 elektrony, w następnej — osiem elektronów. Dlatego węgiel potrzebuje czterech dodatkowych elektronów (lub musiałby oddać cztery elektrony), by uzyskać zewnętrzną powłokę elektronową maksymalnie wypełnioną elektronami. Najstabilniejszy jest wtedy, gdy wykorzystując wspólnie z innymi atomami (w tym z atomami węgla) cztery elektrony, tworzy cztery wiązania kowalencyjne.

D. Węgiel ^{14}C ma w jądrze dodatkowo dwa neutrony. Ponieważ właściwości chemiczne zależą od elektronów, węgiel 14 jest chemicznie identyczny z węglem 12

Odpowiedź 2-2. To prawda. Te same zasady dotyczą zarówno wiązań jonowych, jak i kowalencyjnych: elektrony mogą być wspólnie użytkowane w jednakowym stopniu przez dwa atomy, łącząc je niespolaryzowanym wiązaniem kowalencyjnym. Jeśli elektrony są niejednakowo wykorzystywane przez dwa atomy, tworzy się wiązanie kowalencyjne spolaryzowane. Elektrony mogą całkowicie przejść z jednego atomu na drugi i to prowadzi do powstania wiązania jonowego. Pomiędzy wiązaniem kowalencyjnym a jonowym istnieje wiele stanów pośrednich i jest kwestią zupełnie umowną, czy jakieś wiązanie jest zakwalifikowane do wiązań kowalencyjnych silnie spolaryzowanych, czy do wiązań jonowych.

Odpowiedź 2-3. To prawda. Wiązanie w cząsteczce wody jest spolaryzowane i atom tlenu ma większy ładunek ujemny niż atomy wodoru. Cząstkowe ładunki ujemne są przyciągane przez dodatnio naładowane jony sodowe, a równocześnie są odpychane przez ujemnie naładowane jony chlorkowe.

Odpowiedź 2-4

A. Jony hydroniowe (H_3O^+) pochodzą z wody dysocjującej na protony i jony wodorotlenowe; każdy proton wiąże się z cząsteczką wody ($2H_2O \rightarrow H_2O + H^+ + OH^- \rightarrow H_3O^+ + OH^-$). W odczynie obojętnym, to jest pod nieobecność kwasu dostarczającego jonów H_3O^+ i zasady dostarczającej jonów OH^-, stężenia jonów H_3O^+ i OH^- są jednakowe. Wiemy, że w odczynie obojętnym pH = 7,0 i dlatego stężenie jonów H^+ wynosi 10^{-7} M. Stężenie H^+ jest równe stężeniu H_3O^+.

B. Aby obliczyć stosunek jonów H_3O^+ do cząsteczek H_2O, musimy znać stężenie cząsteczek wody. Masa cząsteczkowa wody wynosi 18 (to znaczy, że 1 mol = 18 g wody), a jeden litr wody ma masę 1 kg. Stężenie wody wynosi więc 55,6 M (= 1000 g/l : 18 g/mol), a stosunek jonów H_3O^+ do cząsteczek wody wynosi $1{,}8 \cdot 10^{-9}$ (= 10^{-7} : 55,6), co oznacza, że spośród miliarda cząsteczek wody o odczynie obojętnym dysocjacji ulegają zaledwie dwie.

Odpowiedź 2-5. Nie musimy przepraszać. Zauważ, że atomy wodoru połączone z atomami tlenu są mniejsze niż wodory połączone z węglem. Odzwierciedla to polaryzację odpowiednich wiązań: wiązanie H—C jest niepolarne, wiązanie H—O jest spolaryzowane. Tlen silniej przyciąga elektrony niż wodór, co powoduje mniejszy promień chmury elektronowej wokół atomu wodoru.

Odpowiedź 2-6. Synteza makrocząsteczek o unikatowej strukturze wymaga, by w każdej pozycji był wykorzystany tylko jeden stereoizomer. Zamiana jednego aminokwasu w formie L na jego izomer D prowadziłaby do powstania innego białka. Tak więc gdyby do syntezy białek były wykorzystywane równocześnie izomery L i D, sekwencja aminokwasów takiego białka nie określałaby jednej określonej struktury, ale mieszaninę rozmaitych struktur (powstałoby 2^N różnych struktur, gdzie N jest liczbą reszt aminokwasów w białku). Nie wiadomo, dlaczego ewolucja wybrała L-aminokwasy jako elementy konstrukcyjne białek. Z łatwością można by sobie wyobrazić komórkę, w której niektóre (albo nawet wszystkie) aminokwasy białkowe byłyby izomerami D, pod warunkiem, że do budowy białka byłyby wykorzystywane wyłącznie te stereoizomery, nie zaś ich mieszanina.

Odpowiedź 2-7. Określenie *polarność* może mieć dwa znaczenia. W jednym znaczeniu odnosi się do asymetrii kierunkowej liniowych polimerów, takich jak polipeptydy, mające koniec aminowy i karboksylowy, lub kwasy nukleinowe z końcem 3' i 5'. Ponieważ wiązania powstają tylko między grupami aminową i karboksylową aminokwasów tworzących polipeptyd, lub między końcami 3' i 5' nukleotydów, kwasy nukleinowe i polipeptydy zawsze mają dwa różne końce, które nadają łańcuchom określoną polarność (kierunkowość).
Inne znaczenie *polarności* dotyczy rozdzielania się ładunków elektrycznych w wiązaniu chemicznym lub w cząsteczce. Ten rodzaj polarności umożliwia powstawanie wiązań wodorowych. Ponieważ rozpuszczalność w wodzie (hydrofilowość) jakiejś cząsteczki zależy od jej zdolności do tworzenia wiązań wodorowych, termin ten jest czasami wykorzystywany jako synonim zdolności do rozpuszczania się w wodzie.

Odpowiedź 2-8. Główną zaletą reakcji kondensacji jest jej odwracalność podczas hydrolizy (woda w komórce jest łatwo dostępna). Umożliwia to komórkom rozkład własnych makrocząsteczek (lub pochodzących z substancji przyjmowanych jako pokarm) i ponowne wykorzystanie uwolnionych jednostek monomerycznych do budowania nowych makrocząsteczek.

Odpowiedź 2-9. Wiele funkcji spełnianych przez makrocząsteczki zależy od ich zdolności do łatwej asocjacji i dysocjacji. Umożliwia to komórkom przemodelowanie swego wnętrza podczas ruchu lub podziału komórkowego oraz transport cząsteczek pomiędzy organellami. Niektóre makrocząsteczki są jednak wzajemnie połączone wiązaniami kowalencyjnymi. Zachodzi to przede wszystkim w takich sytuacjach, kiedy wymagana jest nadzwyczajna stabilność strukturalna, jak w przypadku ścian komórek bakterii, grzybów i roślin oraz w matriks zewnątrzkomórkowej, stanowiącej dla większości komórek zwierzęcych rodzaj zewnętrznego rusztowania.

Odpowiedź 2-10

A. Prawdziwe. W skład jąder atomowych wchodzą dodatnio naładowane protony oraz elektroobojętne neutrony. Jedynym wyjątkiem jest wodór, którego jądro zawiera tylko jeden proton i nie zawiera neutronów.

B. Nieprawdziwe. Atomy są elektroobojętne. Liczba dodatnio naładowanych protonów zawsze jest zrównoważona jednakową liczbą ujemnie naładowanych elektronów.

C. Prawdziwe — ale tylko w odniesieniu do jądra komórkowego (patrz rozdział 1), a nie do omawianego w tym rozdziale jądra atomowego.

D. Nieprawdziwe. Pierwiastki mogą mieć różne izotopy, różniące się liczbą neutronów

E. Prawdziwe. W niektórych izotopach liczba neutronów destabilizuje jądro, które ulega rozpadowi promieniotwórczemu.

F. Prawdziwe. Przykładami są ziarna glikogenu — polimeru glukozy występujące w komórkach wątroby oraz kropelki tłuszczu powstające w komórkach tłuszczowych przez skupianie się triacylogliceroli.

G. Prawdziwe. Poszczególne wiązania te są bardzo słabe i łatwo ulegają zerwaniu pod wpływem ruchów termicznych. Ponieważ jednak podczas interakcji dwóch makrocząsteczek wytwarza się duża ilość wiązań tego typu, w sumie wiązanie jest całkiem silne. Wiązania wodorowe mogą tworzyć się tylko między grupami poprawnie usytuowanymi na oddziałujących ze sobą makrocząsteczkach, i dlatego są bardzo specyficzne.

Odpowiedź 2-11

A. Cząsteczka celulozy ma masę cząsteczkową $n \cdot (12[C] + 2 \cdot 1[H] + 16[O])$. Nie znamy wartości n, ale możemy określić stosunek mas, w jakim są połączone poszczególne pierwiastki w celulozie. Udział węgla wynosi 40% [12 : (12 + 2 + 16) ·100%]. Z tego wynika, że w 5 g celulozy tworzącej tę kartkę znajdują się 2 g węgla (40% od 5).

Masa molowa węgla wynosi 12 g/mol, a w każdym molu jakiegoś pierwiastka znajduje się $6 \cdot 10^{23}$ atomów. Możemy z tego wyliczyć, że kartka ta zawiera 10^{23} atomów węgla [(2 g : 12 g/mol) · $6 \cdot 10^{23}$ atomów na mol].

B. Objętość tej strony wynosi $4 \cdot 10^{-6}$ m³ (21 cm · 27,5 cm · 0,07 mm), co równa się sześcianowi o boku 1,6 cm (= $4 \cdot 10^{-6}$ m³) Ponieważ z części A zadania wiemy, że kartka zawiera 10^{23} atomów węgla, na podstawie zasad geometrii obliczamy, że wzdłuż boku tego sześcianu można ułożyć $4{,}6 \cdot 10^{7}$ atomów węgla [$(10^{23})^{1/3}$] wbudowanych w celulozę. Stąd obliczamy, że na odcinku równym grubości tej kartki znajduje się około 200000 atomów węgla [$(4{,}6 \cdot 10^{7} \cdot 0{,}07 \cdot 10^{-3}$ m) : $1{,}6 \cdot 10^{-2}$ m].

C. Na odcinku 0,07 mm (grubość tej kartki) zmieściłoby się *350000 ciasno poukładanych atomów o średnicy* 0,2 nm, czyli 1,75 razy więcej niż wyliczono w punkcie B. Różnica w obliczeniach w punkcie B i obecnym wynika stąd, że: (1) węgiel nie jest jedynym rodzajem atomów wchodzących w skład celulozy, (2) papier nie jest siatką krystaliczną z precyzyjnie poukładanymi cząsteczkami celulozy (przykładem takiej siatki dla atomów węgla byłby diament), ale mieszaniną włókien o różnej objętości.

Odpowiedź 2-12

A. W pierwszej, drugiej i trzeciej powłoce elektronowej maksymalnie może się znajdować odpowiednio 2, 8 i 8 elektronów.

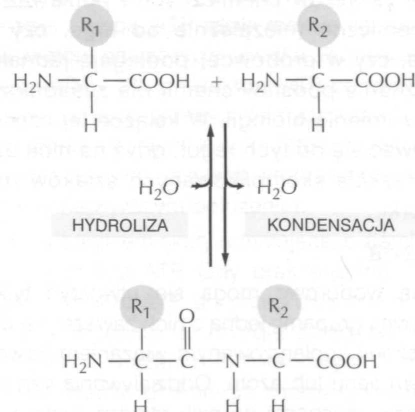
B.

wodór	przyjąć 1 lub oddać 1
hel	ma całkowicie wypełnioną powłokę
tlen	przyjąć 2
węgiel	przyjąć 4 lub oddać 4
sód	oddać 1
chlor	przyjąć 1

C. Hel z całkowicie wypełnioną zewnętrzną powłoką elektronową jest chemicznie bierny. Sód i chlor są natomiast bardzo reaktywne i łatwo tworzą trwałe jony Na^+ i Cl^- zdolne do tworzenia wiązań jonowych. Tlen musi przyjąć dwa elektrony, podczas gdy wodór może albo przyjąć albo oddać pojedynczy elektron. W wiązaniu kowalencyjnym pomiędzy tlenem a wodorem, takim jak w wodzie lub w grupie hydroksylowej, elektrony są przesunięte w kierunku atomu tlenu. Powstaje więc wiązanie spolaryzowane z cząstkowym ujemnym ładunkiem na atomie tlenu i cząstkowym ładunkiem dodatnim na atomie wodoru. W podobny sposób jest spolaryzowane wiązanie tlen–węgiel. Inaczej zaś w wiązaniu wodór–węgiel: obydwa atomy w jednakowym stopniu wykorzystują wspólne elektrony i wiązanie nie jest spolaryzowane.

Odpowiedź 2-13. Atom siarki jest znacznie większy niż atom tlenu i dlatego zewnętrzne elektrony siarki nie są tak mocno przyciągane przez jądro jak w atomie tlenu. W rezultacie wiązanie wodór-siarka jest znacznie mniej spolaryzowane niż wiązanie wodór-tlen. Ze względu na mniejszą polarność wiązania, siarka w cząsteczce H_2S nie jest silnie przyciągana przez atomy wodoru w sąsiednich cząsteczkach H_2S i w rezultacie wiązania wodorowe nie tworzą się.

Odpowiedź 2-14



Rys. O2-14

gdzie R_1 i R_2 są łańcuchami bocznymi aminokwasów.

Odpowiedź 2-15

A. Nieprawdziwe. Właściwości białek zależą zarówno od wchodzących w ich skład aminokwasów, jak i od kolejności, w jakiej są one połączone. Różnorodność białek wynika z prawie nieograniczonej liczby kombinacji, w jakich może połączyć się 20 aminokwasów tworząc liniowy polimer.

B. Nieprawdziwe. Lipidy tworzą dwuwarstwy bez udziału wiązań kowalencyjnych. Toteż błona komórkowa nie jest makrocząsteczką.

C. Prawdziwe. Rdzeń kwasów nukleinowych stanowi łańcuch przemiennie ułożonych reszt rybozy (lub deoksyrybozy w DNA) i grup fosforanowych. Ryboza i deoksyryboza są cukrami.

D. Prawdziwe. Około połowy spośród 20 aminokwasów białkowych ma hydrofobowe łańcuchy boczne. W pofałdowanych cząsteczkach białek wiele tych reszt jest skierowanych do wnętrza cząsteczki, ponieważ są one odpychane przez wodę.

E. Prawdziwe. Hydrofobowe „ogony" węglowodorowe zawierają wyłącznie niespolaryzowane wiązania. Nie mogą więc uczestniczyć w wiązaniach wodorowych i są odpychane przez wodę. Podstawy tego zjawiska szerzej omówiono w rozdz. 11.

F. Nieprawdziwe. Wymienione cztery zasady zawiera RNA, natomiast w DNA zamiast U występuje T. Wzory T i U są bardzo podobne, różnią się jedynie grupą metylową (grupa ta znajduje się w T, ale nie ma jej w U).

Odpowiedź 2-16

A. a) 400 (20^2); b) 8000 (20^3); c) 160000 (20^4).

B. Białko o masie cząsteczkowej 4800 zawiera około 40 aminokwasów. Można by z nich utworzyć $20^{40} = 1{,}1 \cdot 10^{52}$ różnych cząsteczek. Każda z nich miałaby masę 4800 : ($6 \cdot 10^{23}$) = = $8 \cdot 10^{-21}$ g. Mieszanina zawierająca po jednej z tych cząsteczek ważyłaby zatem ($8 \cdot 10^{-21}$g) · ($1{,}1 \cdot 10^{52}$) = $9 \cdot 10^{31}$ g, a więc 15000 razy więcej niż Ziemia, ważąca $6 \cdot 10^{27}$ g. Istotnie, potrzebny byłby całkiem duży pojemnik!

C. Jeśli przyjąć, że przeważnie białka komórkowe są większe niż w podanym przykładzie, jasne jest, że żywe organizmy wykorzystują jedynie znikomo mały ułamek wszystkich możliwych kombinacji sekwencji aminokwasów.

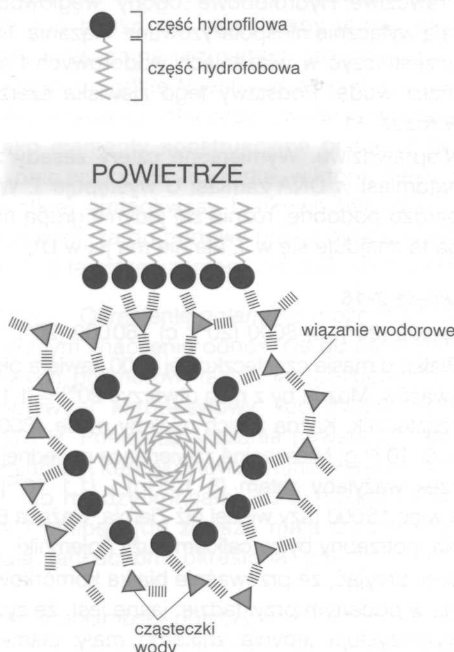
Odpowiedź 2-17. Ponieważ wszystkie żywe komórki składają się ze związków chemicznych i ponieważ wszystkie reakcje chemiczne (niezależnie od tego, czy zachodzą w komórce, czy w probówce) podlegają jednakowym regułom, poznanie podstaw chemii ma zasadnicze znaczenie dla zrozumienia biologii. W książce tej często będziemy odwoływać się do tych reguł, gdyż na nich opierają się wszystkie reakcje skomplikowanych szlaków metabolicznych komórki.

Odpowiedź 2-18

A. Wiązania wodorowe mogą się utworzyć tylko między określonymi grupami; jedną z nich zawsze jest atom wodoru połączony spolaryzowanym wiązaniem kowalencyjnym z atomem tlenu lub azotu. Oddziaływania van der Waalsa są słabsze i dochodzi do nich między dwoma dowolnymi atomami pod warunkiem ich dostatecznie dużego zbliżenia się. Zarówno wiązania wodorowe, jak i oddziaływania van der Waalsa są *oddziaływaniami krótkiego zasięgu, które* dochodzą do głosu, gdy dwie cząsteczki znajdują się blisko siebie. Obydwa typy wiązań można dlatego traktować jako „dokładne dostrojenie" oddziaływania, na przykład poprawne wzajemne usytuowanie cząsteczek, które zetknęły się już ze sobą w wyniku dyfuzji.

B. We wszystkich trzech przykładach dojdą do głosu oddziaływania van der Waalsa. Wiązania wodorowe powstaną tylko w c).

Odpowiedź 2-19. Oddziaływania niekowalencyjne zachodzą między jednostkami monomerycznymi makrocząsteczek — na przykład między łańcuchami bocznymi aminokwasów w polipeptydach — i powodują, że łańcuch polipeptydowy uzyskuje unikatowy kształt. Oddziaływania te obejmują wiązania wodorowe, interakcje jonowe, oddziaływania van der Waalsa i interakcje hydrofobowe. Ponieważ oddziaływania te są słabe, można je stosunkowo łatwo zerwać. Większość makrocząsteczek może wskutek tego ulec rozfałdowaniu podczas ogrzewania wzmagającego ruchy termiczne cząsteczek.



Rys. O2-20

Odpowiedź 2-20. Cząsteczki amfipatyczne mają stronę hydrofilową i stronę hydrofobową. Ich obszary hydrofilowe mogą być związane wodorowo z cząsteczkami wody, ale rejony hydrofobowe są przez wodę odpychane, gdyż wprowadzają zaburzenia do jej struktury. W rezultacie hydrofobowe końce cząsteczek amfipatycznych na granicy woda–powietrze mają tendencję do ekspozycji w kierunku powietrza lub do łączenia się w skupiska — micele (rys. O2-20).

Odpowiedź 2-21

A, B. (A) i (B) są poprawnymi wzorami aminokwasu fenyloalaniny. Wzór B przedstawia fenyloalaninę w formie zjonizowanej, istniejącej w wodnym roztworze, gdzie grupa aminowa ulega protonacji, a karboksylowa jest pozbawiona protonu.

C. Wzór błędny. W peptydzie brakuje atomu wodoru związanego z azotem.

D. Błędny. Wzór adeniny zawiera o jedno wiązanie podwójne za dużo — tworzyłby się pięciowartościowy atom węgla.

E. Błędny. Ten wzór trifosforanu nukleozydu powinien zawierać dodatkowo dwa atomy tlenu, każdy pomiędzy atomami fosforu.

F. Jest to poprawny wzór etanolu.

G. Błędny. Woda nie tworzy wiązań wodorowych z atomami wodoru związanymi z węglem. Brak możliwości tworzenia wiązań wodorowych decyduje, że węglowodory są hydrofobowe.

H. Błędny. Na i Cl tworzą wiązanie jonowe (Na^+Cl^-), a narysowane jest wiązanie kowalencyjne.

I. Błędny. Atom tlenu przyciąga elektrony silniej niż atom węgla; polarność obu wiązań powinna więc być zaznaczona odwrotnie.

J. Strukturę glukozy przedstawiono poprawnie.

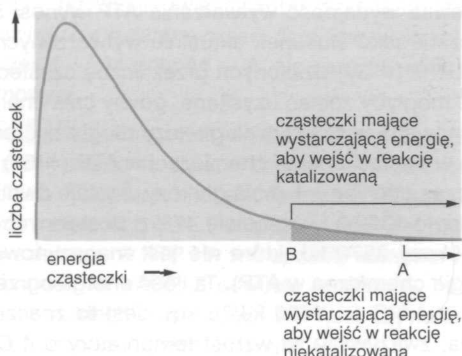
K. Prawie dobrze. Byłoby lepiej pokazać, że tylko jeden wodór opuścił grupę $—NH_2$, oraz że grupa —OH została oderwana od grupy —COOH.

Rozdział 3

Odpowiedź 3-1. Równanie jest równaniem sumarycznym ogromnej liczby poszczególnych reakcji katalizowanych przez wiele oddzielnych enzymów. Ponieważ cukry są bardziej skomplikowanymi cząsteczkami niż CO_2 i H_2O, reakcja tworzy wewnątrz komórki stan bardziej uporządkowany. Jak wymaga tego drugie prawo termodynamiki, ciepło uwalniane jest w wielu etapach szlaku reakcji, które są podsumowane w tym równaniu.

Odpowiedź 3-2. Utlenianie definiuje się jako usunięcie elektronów. Stąd (A) jest utlenianiem, a (B) jest redukcją. Zaznaczony kolorem *czerwonym* atom węgla w (C) pozostaje w zasadzie niezmieniony; jednakże sąsiadujący atom węgla traci atomu wodoru (tj. elektron i proton) i stąd ulega utlenieniu. Zaznaczony atom węgla w (D) staje się utleniony, ponieważ traci atom wodoru, natomiast zaznaczony atom węgla w (E) staje się zredukowany ponieważ, przyłącza atom wodoru.

Odpowiedź 3-3. Szybkość reakcji mogą ograniczać: (1) stężenie substratu, tzn. częstość zderzeń cząsteczek CO_2 z miejscem aktywnym enzymu; (2) to, jak wiele z tych kolizji jest wystarczająco energicznych, by doprowadzić do reakcji; oraz (3) to, jak szybko enzym może uwalniać produkt reakcji, aby był zdolny do związania następnego substratu. Wykres na rys. O3-3 pokazuje, że w wyniku obniżenia bariery energii aktywacji więcej cząsteczek ma wystarczającą energię, aby ulec reakcji. Pole pod krzywą od punktu A do nieskończoności lub od punktu B do nieskończoności przedstawia całkowitą liczbę cząsteczek, które ulegną reakcji odpowiednio w nieobecności lub w obecności enzymu. Choć nie narysowano skali, proporcja między tymi obszarami powinna wynosić 10^7.



Rys. O3-3

Odpowiedź 3-4

A. Oba stany monety, O i R mają równe prawdopodobieństwo. Stąd nie istnieje siła napędowa, tj. nie ma różnicy energii, która mogłaby sprzyjać obrotowi O w R lub odwrotnie. Zatem dla tej reakcji $\Delta G° = 0$. Jednakże reakcja zachodzi, jeżeli monety O i R są w pudełku w niejednakowej ilości. Teraz różnica stężenia pomiędzy O i R tworzy siłę napędową, $\Delta G° \neq 0$ dla reakcji aż do osiągnięcia równowagi, tj. aż do wyrównania liczby O i R.

B. Liczba wstrząsów odpowiada temperaturze, jako że wpływa na „termiczny" ruch monet. Energia aktywacji reakcji jest energią, która musi być zużyta do postawienia monety na jej krawędzi, skąd może przewrócić się każdą stoną ku górze. „Potrząsacz" mógłby przyspieszyć ten proces obniżając potrzebną do tego energię; mógłby na przykład być magnesem zawieszonym nad pudełkiem i pomagać monetom unosić się do góry. „Potrząsacz" nie działałby tam, gdzie jest równowaga (równa liczba O i R), ale przyspieszałby proces osiągania stanu równowagi, ponieważ w obecności „enzymu" więcej monet przeskakiwałoby tam i z powrotem.

Odpowiedź 3-5. Patrz rys. O3-5. Zauważ, że $\Delta G°_{X\to Y}$ jest dodatnia, natomiast $\Delta G°_{Y\to Z}$ i $\Delta G°_{X\to Z}$ są ujemne. Wykres pokazuje także, że $\Delta G°_{X\to Z} = \Delta G°_{X\to Y} + \Delta G°_{Y\to Z}$. Dane z rysunku 3-12 nie informują o wysokości barier energii aktywacji; dlatego są one narysowane w umownej wysokości (*linie ciągłe*). Mogą one być obniżone przez enzymy katalizujące te reakcje, co zwiększy szybkość reakcji (*linie kropkowane*).

Odpowiedź 3-6

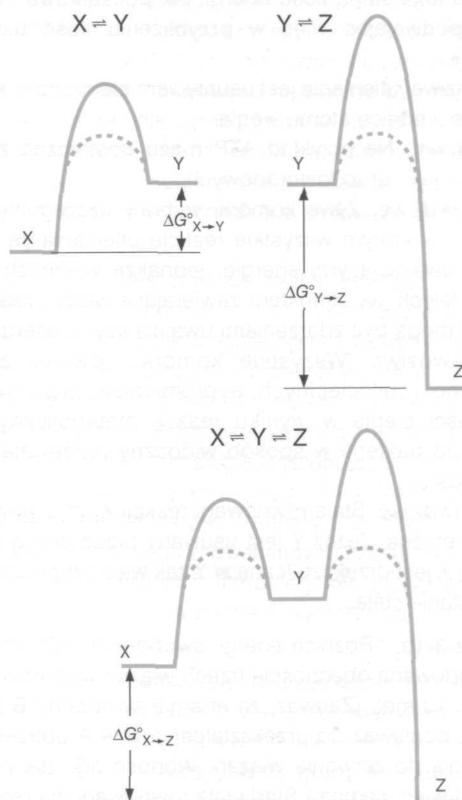
A. Skały na rysunku 3-24B dostarczają energii do podniesienia wiader z wodą. ATP zasila reakcję; tak więc ATP odpowiada skałom na szczycie urwiska. Rumowisko skalne odpowiada ADP i (P), produktom ATP po uwolnieniu energii i wykonaniu pracy. W reakcji tej hydroliza ATP jest sprzężona z przekształceniem X w Y. Zatem X jest początkowym materiałem (wiadro na ziemi), który jest przekształcany w Y (wiadro w najwyższym położeniu).

B. a) Odpowiednikiem skały uderzającej o ziemię byłaby bezcelowa hydroliza ATP. Gdy brak enzymu, zużywającego energię hydrolizy ATP do przeprowadzenia reakcji niekorzystnej energetycznie, energia zmagazynowana w bezwodnikowym wiązaniu fosforanowym byłaby stracona w postaci ciepła. b) Energia zmagazynowana w Y może być użyta do przeprowadzenia innej reakcji. Jeżeli Y stanowi np. zaktywowaną formę aminokwasu X, to może ulec reakcji kondensacji, tworząc wiązanie peptydowe w czasie syntezy białka.

Odpowiedź 3-7. Energia swobodna ΔG uzyskana z hydrolizy ATP zależy zarówno od $\Delta G°$, jak i od stężenia substratów i produktów. W tym przypadku

$$\Delta G = -50{,}3 \text{ kJ/mol} = -30{,}7 \text{ kJ} + 2{,}578 \ln \frac{[ADP] \cdot [P]}{[ATP]}$$

ΔG ma wartość bardziej ujemną niż $\Delta G°$, ponieważ stężenie ATP w komórce jest duże (rzędu milimolarnego), a stężenie



Rys. O3-5

ADP jest małe (rzędu 10 μM). Stosunek stężeń w tym równaniu jest więc mniejszy od 1, a jego logarytm ma wartość ujemną.

$\Delta G°$ jest wartością stałą dla reakcji i nie zmienia się z warunkami reakcji. Natomiast ΔG zależy od stężeń ATP, ADP i fosforanu, co do których komórki mogą się trochę różnić.

Odpowiedź 3-8. Reakcje B, C, D i E wymagają sprzężenia z innymi, energetycznie korzystnymi reakcjami. W każdym z tych przypadków są tworzone wysoko zorganizowane struktury, które są bardziej skomplikowane i mają więcej wiązań „wysokoenergetycznych" niż materiał wyjściowy. Natomiast reakcja A (ujęta sumarycznie — *przyp. tłum.*) jest reakcją kataboliczną, która prowadzi do składników o niższym stanie energetycznym i zachodzi spontanicznie.

Odpowiedź 3-9

A. Bliskie prawdy, ale ściśle mówiąc nieprawdziwe. Ponieważ enzymy zwiększają szybkość reakcji, ale nie zmieniają punktu równowagi, reakcja będzie zawsze zachodzić także gdy brak enzymu, choć przeważnie z minimalną szybkością. Co więcej, konkurencyjne reakcje mogą szybko zużywać substrat, a więc jeszcze bardziej ograniczać pożądaną reakcję. Stąd w praktyce bez enzymu niektóre reakcje nigdy nie zajdą w spodziewanym zakresie.

B. Nieprawdziwe. Elektrony na wyższym poziomie energetycznym są dużo łatwiej przenoszone, tj. słabiej związane z cząsteczką donora. Nie oznacza to, że poruszają się szybciej.

C. Prawdziwe. Hydroliza ATP do AMP daje także cząsteczkę pirofosforanu (PP_i), która następnie ulega hydrolizie do dwóch cząsteczek fosforanu. Ta druga reakcja uwalnia prawie taką samą ilość energii jak początkowa hydroliza ATP, podwajając więc w przybliżeniu ilość uzyskanej energii.

D. Prawdziwe; utlenianie jest usunięciem elektronów, które redukuje średnicę atomu węgla.

E. Prawdziwe. Na przykład ATP może dostarczać zarówno energii, jak i grup fosforanowych.

F. Nieprawdziwe. Żywe komórki wybrały szczególny rodzaj chemii, w którym wszystkie reakcje utleniania są zdarzeniami uwalniającymi energię; jednakże w innych warunkach, takich jak atmosfera zawierająca wodór, reakcje redukcji mogą być zdarzeniami uwalniającymi energię.

G. Nieprawdziwe. Wszystkie komórki, również zwierząt zmienno- i stałocieplnych, wypromieniowują porównywalne ilości ciepła w wyniku reakcji metabolicznych. Na przykład bakterie w sposób widoczny ogrzewają kopiec kompostu.

H. Nieprawdziwe. Stała równowagi reakcji X $\rightleftarrows$ Y pozostanie niezmieniona. Jeżeli Y jest usuwany przez drugą reakcję, więcej X jest przekształcane w Y, tak więc proporcja X do Y pozostanie stała.

Odpowiedź 3-10. Różnica energii swobodnej ($\Delta G°$) między B i A spowodowana obecnością trzech wiązań wodorowych wynosi –12,6 kJ/mol. (Zauważ, że energia swobodna B jest niższa niż A, ponieważ do przekształcenia B w A potrzebna będzie energia do zerwania wiązań. Wartość $\Delta G°$ dla przejścia A $\rightarrow$ B jest więc ujemna.) Stąd stała równowagi dla reakcji wynosi ok. 100 (z tab. 3-1, s. 92) tzn. że w stanie równowagi jest 100 razy więcej cząsteczek B niż A. Dodatkowe trzy wiązania wodorowe zwiększyłyby $\Delta G°$ do –25,2 kJ/mol oraz stałą równowagi 100-krotnie, a więc do 10^4. Tak więc stosunkowo małe różnice energii mogą mieć duże znaczenie dla stanu równowagi.

Odpowiedź 3-11. Twierdzenie jest prawdziwe. Kryterium tego, czy reakcja zajdzie spontanicznie jest nie $\Delta G°$ ale ΔG, uwzględniające stężenia reagujących składników. Na przykład reakcja o ujemnej $\Delta G°$ może nie zajść spontanicznie w warunkach nadmiaru produktu, tzn. gdy jest go więcej niż w stanie równowagi. Odwrotnie, reakcja o dodatniej $\Delta G°$ może przebiegać spontanicznie w warunkach ogromnego nadmiaru substratu.

Odpowiedź 3-12

A. Energii uwalnianej w czasie całkowitego utleniania glukozy do CO_2 i H_2O odpowiada energia dostępna w 57 cząsteczkach ATP (= 2870/50,4).

B. Całkowita wydajność wytwarzania ATP wynosi ok. 53%, obliczana jako stosunek aktualnie wytworzonych cząsteczek ATP (= 30) dzielonych przez liczbę cząsteczek ATP, które mogłyby zostać uzyskane, gdyby cała energia zmagazynowana w cząsteczce glukozy mogła być przechwycona w postaci energii chemicznej w ATP (= 57).

C. Podczas utleniania 1 mola glukozy, zostaje uwolnione jako ciepło 1350 kJ (pozostałe 47% z dostępnych w 1 molu glukozy 2870 kJ, które nie jest magazynowane jako energia chemiczna w ATP). Ta ilość energii ogrzeje Twoje ciało o 4,3°C (= 1490 kJ/75 kg). Jest to znacząca ilość ciepła, zważywszy że wzrost temperatury o 4°C wywoła bardzo wysoką gorączkę oraz że 1 mol glukozy jest to nie więcej niż dwie szklanki cukru.

D. Jeżeli uzyskana energia stanowiłaby tylko 20% zamiast 53% (jak w przykładzie podanym w C), 80% dostępnej energii uwalniałoby się jako ciepło i musiałoby rozproszyć się w Twoim ciele. Produkcja ciepła byłaby 1,5 raza większa, a Twoje ciało uległoby z pewnością przegrzaniu.

E. Wzór chemiczny ATP jest $C_{10}H_{12}O_{13}N_5P_3$, a jego masa cząsteczkowa wynosi 503 g/mol. Twoje odpoczywające ciało hydrolizuje więc ok. 80 mol (= 40 kg/0,503 kg/mol) ATP w ciągu doby (odpowiada to około 4180 kJ uwolnionej energii chemicznej). Ponieważ każdy mol glukozy dostarcza 30 moli ATP, ta ilość energii może być wytworzona w wyniku utleniania 480 g glukozy (= 180 g/mol · 80 mol/ 30).

Odpowiedź 3-13. Naukowiec jest oszustem. 57 cząsteczek ATP może zmagazynować 2870 kJ (= 57 · 50,4 kJ) energii chemicznej, a więc efektywność produkcji ATP z glukozy musiałaby wynosić 99,7% co jest niemożliwe. Nie pozostawiłoby to energii do przekształcenia w ciepło, co jest wymogiem drugiego prawa termodynamiki.

Odpowiedź 3-14

A. Zjedzenie mutanta prawdopodobnie jest bezpieczne. Hydroliza ATP dostarcza średnio –50,4 kJ/mol energii. Ta ilość energii przesuwa punkt równowagi reakcji o ogromny rząd wielkości: ok. 10^8 (z tab. 3-1, s. 92, wynika że –24,0 kJ/mol odpowiada stałej równowagi 10^4; tak więc –50,4 kJ/mol odpowiada ok. 10^8. Zauważ, że dla sprzężonych reakcji energie dodają się, natomiast stałe równowagi ulegają mnożeniu). Stąd, jeżeli energia hydrolizy ATP nie może być wykorzystana przez enzym, to zsyntetyzowane będzie 10^8-krotnie mniej trucizny. Ten przykład pokazuje, że sprzężenie

reakcji z hydrolizą cząsteczki zaktywowanego nośnika może drastycznie przesuwać punkt równowagi.

B. Ryzykowne będzie skonsumowanie tego drugiego mutanta. Zmniejszenie szybkości nie wpływa na jej punkt równowagi, a jeżeli reakcja mogła zachodzić w wystarczająco długim czasie, organizm mutanta jest prawdopodobnie naładowany trucizną. Być może równowaga reakcji nie została osiągnięta, ale nie zaleca się podejmowania ryzyka.

Odpowiedź 3-15

A. Z tabeli 3-1 (s. 92) wiemy, że różnica energii swobodnej 18,0 kJ/mol odpowiada stałej równowagi 10^{-3}, tj. $[A^*]/[A]=10^{-3}$. Stężenie A* jest więc 1000-krotnie mniejsze niż A.

B. Proporcja A do A* nie uległaby zmianie. Obniżenie bariery energii aktywacji zwiększyłoby szybkość reakcji, tzn. umożliwiłoby w danym czasie przejście większej ilości cząsteczek $A \rightarrow A^*$ oraz $A^* \rightarrow A$, ale nie wpłynęłoby na punkt równowagi.

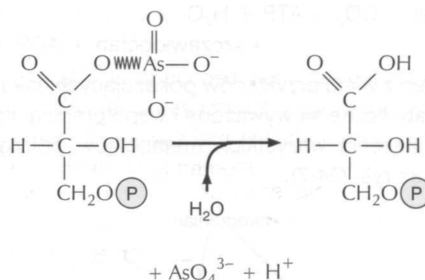
Odpowiedź 3-16. Enzym A jest pożyteczny. Umożliwia wzajemne przekształcenia dwóch cząsteczek nośników energii, z których obie są potrzebne jako formy trifosforanowe w wielu reakcjach metabolicznych. Powstający ADP jest bardzo szybko przekształcany w ATP i w ten sposób komórka zachowuje duży stosunek ATP/ADP. Z powodu enzymu A, nazywanego fosfokinazą nukleotydową, część ATP jest używana do utrzymywania podobnie dużego stosunku GTP/GDP.

Enzym B byłby wysoce szkodliwy dla komórki. Komórki używają NAD^+ jako akceptora elektronów w reakcjach katabolicznych i muszą utrzymywać duże stężenie tej formy nośnika, aby rozłożyć glukozę w celu syntezy ATP. Natomiast NADPH służy jako donor elektronów w reakcjach biosyntezy i jego stężenie jest utrzymywane w komórkach na wysokim poziomie, aby umożliwić syntezę nukleotydów, kwasów tłuszczowych i innych istotnych cząsteczek. Ponieważ enzym B pozbawiałby komórkę rezerw zarówno NAD^+, jak i NADPH, zredukowałby on szybkość reakcji *zarówno* katabolicznych, jak i biosyntetycznych.

Rozdział 4

Odpowiedź 4-1. Komórki, aby utrzymać przebieg glikolizy, muszą przede wszystkim regenerować NAD^+ z NADH. Tego nie można sprawnie zrobić bez fermentacji. Gdyby zabrakło zregenerowanego NAD^+, nie mogłaby zajść reakcja 6 glikolizy (utlenianie aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1,3-bisfosfoglicerynianu, panel 4-1, s. 112–113), a produkt, aldehyd 3-fosfoglicerynian, byłby akumulowany. To samo mogłoby zdarzyć się w komórkach, które nie potrafiłyby wytwarzać ani mleczanu, ani etanolu: żadna z tych komórek nie mogłaby regenerować NAD^+, tak więc glikoliza zostałaby zablokowana na tej reakcji.

Odpowiedź 4-2. Arsenian zostaje dołączony zamiast fosforanu w reakcji 6 glikolizy i tworzy się 1-arseno-3-fosfoglicerynian (rys. O4-2). Z powodu jego podatności w wodzie na hydrolizę, wiązanie „wysokoenergetyczne" ulega zniszczeniu zanim zawierająca je cząsteczka może dyfuzyjnie dotrzeć do następnego enzymu. Produkt hydrolizy, 3-fosfoglicerynian, jest takim samym produktem, jaki normalnie tworzy się w reakcji 7 na skutek działania kinazy fosfoglicerynianowej. Ale ponieważ hydroliza zachodzi nieenzymatycznie, energia uwalniana podczas zrywania wiązania o „wysokoenergetycznego" nie może być wykorzystana do syntezy ATP. Dlatego reakcja odpowiadająca strzałce skierowanej ku dołowi na rys. 4-6 mogłaby nadal zachodzić, ale brakuje „kółka", które umożliwiałoby sprzężenie jej z syntezą ATP. Działając na takiej samej zasadzie, arsenian rozprzęga wiele reakcji przeniesienia grupy fosforanowej i dlatego jest on aż tak toksyczny.



Rys. O4-2

Odpowiedź 4-3. Utlenianie kwasów tłuszczowych tnie łańcuch węglowy na jednostki dwuwęglowe (grupy acetylowe), które łączą się z koenzymem A. Odwrotnie, podczas biogenezy kwasy tłuszczowe powstają na skutek łączenia grup acetylowych. Dlatego większość kwasów tłuszczowych ma parzystą liczbę atomów węgla.

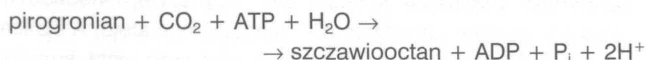
Odpowiedź 4-4. Ponieważ funkcja cyklu kwasu cytrynowego polega na zbieraniu energii uwalnianej podczas utleniania, korzystne jest rozbicie całego procesu na możliwie jak najwięcej reakcji (patrz rys. 4-1). Gdyby posłużyć się związkami dwuwęglowymi, przemiany chemiczne musiałyby być znacznie bardziej ograniczone i nie byłoby możliwe tworzenie tak wielu intermediatów. Zwróć uwagę, że na przykład wiele reakcji tego cyklu utlenia atomy węgla, które przeszły przez więcej niż jeden cykl, a zatem nie pochodzące ze świeżo dodanych grup acetylowych.

Odpowiedź 4-5. Jest prawdą, że tlen powraca do atmosfery jako składnik CO_2. Jednakże CO_2 uwalniany z komórki nie zawiera tych atomów tlenu, które zostały wykorzystane w reakcji fosforylacji oksydacyjnej i przekształcone w wodę (patrz rys. 4-14). Można się o tym bezpośrednio przekonać, inkubując żywe komórki w atmosferze zawierającej tlen cząsteczkowy, w której zamiast naturalnie występującego w dużej ilości izotopu ^{16}O, znajduje się inny izotop, ^{18}O. W takim doświadczeniu stwierdza się, że cały wydzielony CO_2 zawiera wyłącznie ^{16}O. Dlatego atomy tlenu w uwalnianych cząsteczkach CO_2 nie pochodzą bezpośrednio z atmosfery, ale z cząsteczek organicznych, które komórka najpierw syntetyzuje, a później utlenia jako paliwo.

Odpowiedź 4-6. Atomy węgla w cząsteczkach cukrów są już uprzednio częściowo utlenione w przeciwieństwie do wszystkich atomów węgla w łańcuchu kwasów tłuszczowych — oprócz pierwszych, należących do grupy acylowej. W konsekwencji dwa atomy węgla z glukozy ubywają jako CO_2 podczas przekształcania 2 cząsteczek pirogronianu do 2 cząsteczek acetylo-CoA, a poprzez te ostatnie tylko cztery z sześciu

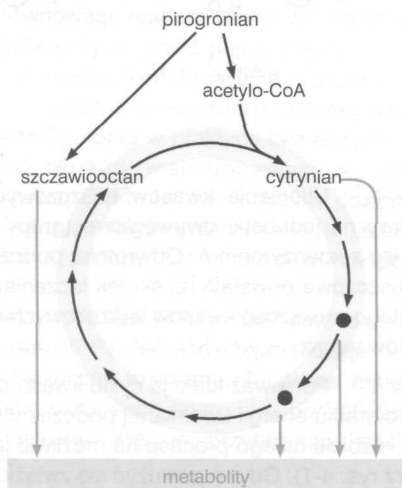
atomów węgla cząsteczki cukru są odzyskiwane i mogą wejść do cyklu kwasu cytrynowego, gdzie przechwytywana jest większość energii. Natomiast podczas utleniania kwasów tłuszczowych wszystkie atomy węgla wchodzą w acetylo-CoA.

Odpowiedź 4-7. Cykl trwa, ponieważ niezbędne intermediaty są uzupełniane przez reakcje prowadzące do cyklu kwasu cytrynowego (a nie przez reakcje wyprowadzające z niego). Jedną z najważniejszych reakcji tego typu jest przekształcenie pirogronianu w szczawiooctan przez enzym karboksylazę pirogronianową:



pirogronian + CO_2 + ATP + H_2O →
→ szczawiooctan + ADP + P_i + $2H^+$

Jest to jeden z wielu przykładów pokazujących, jak precyzyjnie szlaki metaboliczne są wyważone i współpracują, by utrzymać właściwe stężenia wszystkich metabolitów potrzebnych komórce (patrz rys. O4-7).



Rys. O4-7

Odpowiedź 4-8

A. Nieprawdziwe. Gdyby zdarzyła się taka sytuacja, wówczas ta reakcja byłaby bezużyteczna dla komórki. Nie uzyskano by żadnej użytecznej energii chemicznej (np. ATP), którą można by wykorzystać do procesów metabolicznych (chociaż wtedy byłoby miło i ciepło!).

B. Nieprawdziwe. Procesy przekształcające energię nie mogą przebiegać z wydajnością 100%. Pamiętajmy, że entropia we wszechświecie stale wzrasta, bo podczas przebiegu większości reakcji uwalnia się ciepło.

C. Prawdziwe. Atomy węgla glukozy są w stanie zredukowanym w porównaniu z atomami CO_2, które są całkowicie utlenione.

D. Nieprawdziwe. W tych reakcjach wprawdzie powstaje trochę wody, ale — wobec jej obfitości w biosferze — ta ilość stanowi „kroplę w morzu".

E. Prawdziwe. Gdyby zachodziła ona w jednym etapie, wówczas cała energia byłaby uwalniana od razu i niemożliwe byłoby skuteczne zasilanie innych reakcji, np. syntezy ATP.

F. Nieprawdziwe. Tlen cząsteczkowy (O_2) zużywany jest tylko na końcowych etapach tej reakcji.

G. Prawdziwe. Rośliny przekształcają CO_2 w cukry, wykorzystując energię światła w procesie fotosyntezy. W tym procesie rośliny wytwarzają i uwalniają O_2.

H. Bliskie prawdy. Komórki rosnące beztlenowo korzystają z glikolizy, aby utlenić cukry do pirogronianu. Komórki zwierzęce przekształcają pirogronian w mleczan i nie wytwarzają CO_2; natomiast komórki drożdży przemieniają pirogronian w etanol i CO_2. To właśnie uwalniany przez komórki drożdży podczas fermentacji CO_2 w postaci gazowej powoduje, że ciasto na chleb rośnie, a piwo i szampan musują.

Odpowiedź 4-9. Atom węgla oddany z ostatnim tchnieniem Darwina, musiał być atomem węgla wchodzącym w skład cząsteczki CO_2. Po pewnym czasie przebywania w atmosferze, ta cząsteczka CO_2 musiała znaleźć się w komórce roślinnej, gdzie została „uwięziona" przez fotosyntezę i zamieniona na element cząsteczki cukru. O ile oczywiste jest, że ten początkowy etap musiał zajść właśnie w ten sposób, to od tego miejsca atom węgla mógł przebyć różne drogi. Na przykład komórka roślinna mogła rozbijać cukry do pirogronianu lub acetylo-CoA, które z kolei wchodziły w reakcje biosyntezy aminokwasów. Aminokwasy mogły zostać wbudowane w białka roślinne, być może enzymy lub białka budujące ścianę komórkową. Jeśli zjesz smaczną sałatkę z liści rośliny, z białka strawionego w twoim jelicie ponownie otrzymasz aminokwasy. Krążące z krwią aminokwasy mogą zostać wchłonięte przez różnicujące się komórki wyjściowe dla czerwonych krwinek, które zbudują z nich swoje białka, takie jak hemoglobina wspomniana w pytaniu.

Oczywiście, jeżeli chcemy, możemy bardziej skomplikować ten łańcuch pokarmowy. Na przykład roślina mogłaby być zjedzona przez zwierzę, które z kolei zostałoby skonsumowane przez ciebie na obiad. Co więcej, ponieważ Darwin umarł przeszło 100 lat temu, atom węgla mógłby pokonać taką drogę wiele razy. Każdy cykl musiałby on jednak rozpoczynać od nowa jako całkowicie utleniony CO_2 w postaci gazu i wkraczać do świata żywego dopiero po redukcji dokonanej podczas fotosyntezy.

Odpowiedź 4-10. Komórki drożdży rosną znacznie lepiej w warunkach tlenowych. W warunkach beztlenowych nie są w stanie przeprowadzić fosforylacji oksydacyjnej i dlatego wytwarzają wszystkie cząsteczki ATP w glikolizie, która jest mniej wydajna. Podczas gdy jedna cząsteczka glukozy w czasie glikolizy daje netto dwie cząsteczki ATP, to w połączeniu z cyklem kwasu cytrynowego i fosforylacją oksydacyjną wydajność energetyczna wzrasta do około 30 cząsteczek ATP.

Odpowiedź 4-11. Ilość energii swobodnej zmagazynowanej w wiązaniu fosforanowym fosfokreatyny jest większa niż zmagazynowana w bezwodnikowym wiązaniu ATP. Hydroliza fosforanu kreatyny może więc być sprzężona bezpośrednio z produkcją ATP.



fosforan kreatyny + ADP → kreatyna + ATP

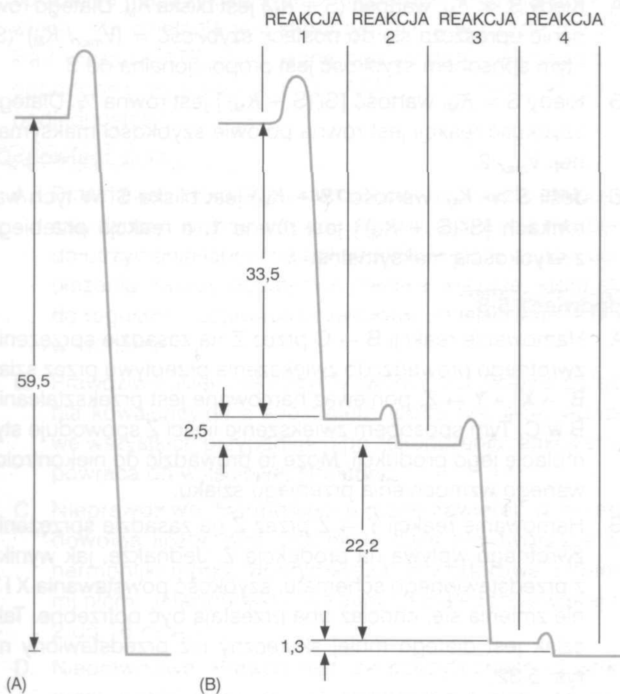
$\Delta G°$ tej reakcji wynosi –12,5 kJ/mol, co wskazuje, że przebiega ona szybko w prawo, jak zaznaczono powyżej.

Odpowiedź 4-12. Skrajny konserwatyzm glikolizy dowodzi, że wszystkie współczesne komórki pochodzą od jednej prakomórki, co omówiono w rozdz. 1. Prawdopodobnie więc perfekcyjne reakcje glikolizy zorganizowały się tylko jednorazowo, a następnie w toku ewolucji komórek były tylko dziedziczone. Fosforylacja oksydacyjna, późniejszy wynalazek ewolucji, wykorzystała te reakcje do uzyskania 15 razy więcej energii, niż

mogła dać sama glikoliza. Tak nadzwyczajna wydajność zbliża się do teoretycznej wartości granicznej i dlatego skutecznie eliminuje okazje do dalszych udoskonaleń. Tak więc tworzenie alternatywnych szlaków nie dawałoby już dla rozwoju organizmów dalszych korzyści, które mogłyby podlegać doborowi w ewolucji.

Odpowiedź 4-13. Jak podano w tekście i w pytaniach 4-8 oraz 4-10, podczas utleniania każdej cząsteczki glukozy powstaje 30 cząsteczek ATP zgodnie z reakcją: $C_6H_{12}O_6$ (glukoza) + $6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$ + energia. A zatem na każde pięć wytworzonych cząsteczek ATP zostaje zużyta jedna cząsteczka O_2. Komórka zużywa więc $2 \cdot 10^8$ cząsteczek O_2/min, co odpowiada zużyciu $3{,}3 \cdot 10^{-16}$ mol [= $(2 \cdot 10^8) : (6 \cdot 10^{23})$] lub $7{,}4 \cdot 10^{-15}$ litra (=$3{,}3 \cdot 10^{-16} \cdot 22{,}4$) w każdej minucie. Objętość komórki wynosi 10^{-15} m^3 [= $(10^{-5})^3$], to jest 10^{-12} litra. Tak więc komórka zużywa w każdej minucie tyle gazowego O_2, ile odpowiada ok. 0,7% (=$100 \cdot 7 \cdot 10^{-15} : 10^{-12}$) jej objętości; innymi słowy ilość gazowego O_2 odpowiadająca całej objętości komórki zostanie zużyta w ciągu 2 godz. i 15 min.

Odpowiedź 4-14. Każda z reakcji ma ujemną wartość ΔG i dlatego są one energetycznie korzystne (patrz rys. O4-14 przedstawiający schemat zmian energii).

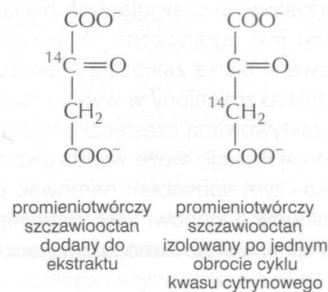


Rys. O4-14

Odpowiedź 4-15

A. Pirogronian zostanie przekształcony w acetylo-CoA, a znakowany atom ^{14}C uwolniony w postaci $^{14}CO_2$ (patrz rys. 4-8B).

B. Śledząc atom ^{14}C w każdej reakcji cyklu pokazanej w panelu 4-2 (s. 122–123) odkryjesz, że dodany znakowany ^{14}C można by ilościowo odzyskać w szczawiooctanie. Jednak analiza również ujawnia, że po krótkim czasie przechodzi on z grupy ketonowej do metylenowej grupy szczawiooctanu (rys. O4-15).



Rys. O4-15

Odpowiedź 4-16. W obecności tlenu cząsteczkowego fosforylacja oksydacyjna przekształca większość komórkowego NADH w NAD^+. Ponieważ fermentacja wymaga NADH, dostęp tlenu gazowego silnie ją hamuje.

Rozdział 5

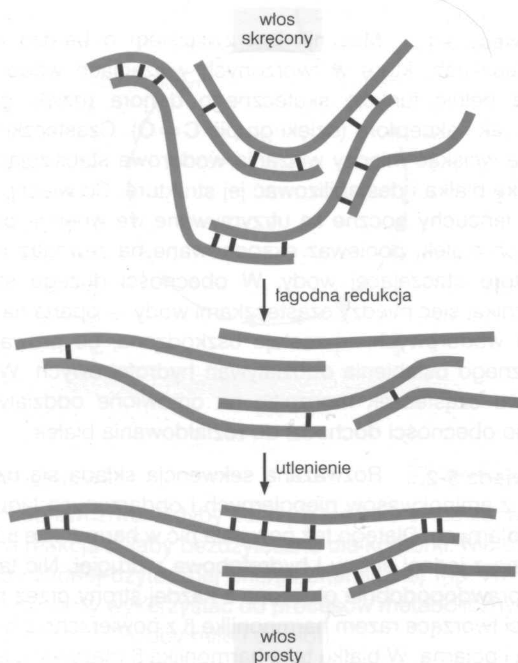
Odpowiedź 5-1. Mocznik jest związkiem o bardzo małych cząsteczkach, które w tworzonych wiązaniach wodorowych mogą pełnić funkcję skutecznego donora (dzięki grupom NH_2), jak i akceptora (dzięki grupie C=O). Cząsteczki te mogą się wciskać między wiązania wodorowe stabilizujące cząsteczkę białka i destabilizować jej strukturę. Co więcej, niepolarne łańcuchy boczne są utrzymywane we wnętrzu pofałdowanych białek, ponieważ eksponowane na zewnątrz niszczą strukturę otaczającej wody. W obecności dużego stężenia mocznika, sieć miedzy cząsteczkami wody — oparta na wiązaniach wodorowych — zostaje uszkodzona, co prowadzi do znacznego osłabienia oddziaływań hydrofobowych. Wskutek wpływu cząsteczek mocznika na omówione oddziaływania, w jego obecności dochodzi do rozfałdowania białek.

Odpowiedź 5-2. Rozważana sekwencja składa się na przemian z aminokwasów niepolarnych i obdarzonych ładunkiem lub polarnych. Dlatego też powstała nić w harmonijce β będzie polarna z jednej strony i hydrofobowa z drugiej. Nić taka będzie prawdopodobnie otoczona z każdej strony przez podobne nici tworzące razem harmonijkę β z powierzchnią hydrofobową i polarną. W białku taka harmonijka β (nazywana amfipatyczną; gr.: amphi — „dwojakiego rodzaju" i pathos — „pasja", ze względu na dwie powierzchnie o tak różnych właściwościach) będzie ułożona w ten sposób, że strona hydrofobowa będzie skierowana ku wnętrzu białka, a część polarna znajdzie się na powierzchni i będzie się kontaktować z cząsteczkami wody otaczającymi białko.

Odpowiedź 5-3. Mutacje korzystne dla organizmu podlegają w toku ewolucji pozytywnej selekcji, ponieważ oddziałują dodatnio na wzrost lub możliwość przeżycia organizmu. Mutacje takie mogą prowadzić do lepszego wykorzystania zasobów pokarmu, zwiększenia odporności na niekorzystne warunki środowiska, takie jak podwyższona temperatura lub zasolenie, lub zwiększenia atrakcyjności seksualnej, a więc zarazem możliwości reprodukcji. Natomiast akumulacja bezużytecznych białek jest szkodliwa dla organizmu. Bezużytecznie zmutowane białka marnują energię metaboliczną niezbędną do ich powstania. Jeżeli białka takie powstałyby w nadmiarze, odbiło-

by się to niekorzystnie na prawidłowych białkach, jako że pojemność komórki jest ograniczona. W poważniejszych przypadkach zmutowane białka zakłócają prawidłową działalność komórki; na przykład zmieniony w wyniku mutacji enzym, który nadal wiąże zaktywowaną cząsteczkę nośnika, ale nie katalizuje odpowiedniej reakcji, może współzawodniczyć o wiązanie tego nośnika i tym sposobem hamować prawidłowy proces. Selekcja naturalna stanowi więc potężną siłę napędową prowadzącą do eliminacji zarówno bezużytecznych, jak i szkodliwych białek.

Odpowiedź 5-4. Silne czynniki redukujące, które zrywają wszystkie wiązania S—S, spowodowałyby rozdzielenie wszystkich włókien keratyny. W takim przypadku włos by się rozpadł. W praktyce silnie czynniki redukujące stosuje się powszechnie w kremach usuwających włosy (depilujących), dostępnych w aptece lub drogerii. Z kolei łagodne czynniki redukujące znajdują zastosowanie w prostowaniu lub skręcaniu włosów, przy czym do skręcenia trzeba użyć wałków (patrz rys. O5-4).



Rys. O5-4

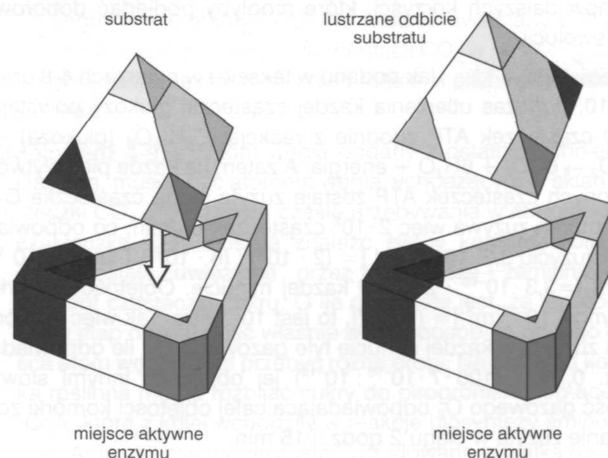
Odpowiedź 5-5

A. Stała równowagi $K = [AB]/([A]\cdot[B])$. Nawiasy kwadratowe oznaczają tu stężenie. Stąd, jeśli A, B i AB występują w stężeniu 1 μM (10^{-6} M), to $K = 10^{6}\ M^{-1}$ [$= 10^{-6}/(10^{-6}\cdot10^{-6})$].

B. Podobnie, jeśli A, B i AB występują w stężeniu 1 nM (10^{-9} M), to $K = 10^{-9}\ M^{-1}$.

C. Przykład ten ilustruje konieczność wiązania z dużym powinowactwem, występującą w przypadku oddziaływania ze sobą białek, które w komórkach występują w mniejszych stężeniach. Wskutek tego w stanie równowagi znaczna część cząsteczek pozostaje związana. W tym szczególnym przypadku utrzymanie kompleksu AB po zmniejszeniu stężenia o trzy rzędy wielkości (z μM do nM) wymaga zmiany stałej równowagi o trzy rzędy wielkości (co odpowiada –18 kJ energii swobodnej, rys. 5-26). Oznacza to w przybliżeniu 4–5 dodatkowych wiązań wodorowych.

Odpowiedź 5-6



Rys. O5-6

Odpowiedź 5-7

A. Kiedy S ≪ K_M, wartość (S + K_M) jest bliska K_M. Dlatego równanie upraszcza się do postaci: szybkość = $(V_{max}/K_M)\cdot(S)$ i tym sposobem szybkość jest proporcjonalna do S.

B. Kiedy S = K_M, wartość [S/(S + K_M)] jest równa ½. Dlatego szybkość reakcji jest równa połowie szybkości maksymalnej: $V_{max}/2$.

C. Jeśli S ≫ K_M, wartość (S + K_M) jest bliska S. W tych warunkach [S/(S + K_M)] jest równe 1, a reakcja przebiega z szybkością maksymalną.

Odpowiedź 5-8

A. Hamowanie reakcji B → C przez Z na zasadzie sprzężenia zwrotnego prowadzi do zwiększenia przepływu przez szlak B → X → Y → Z, ponieważ hamowane jest przekształcanie B w C. Tym sposobem zwiększenie ilości Z spowoduje stymulację jego produkcji. Może to prowadzić do niekontrolowanego wzmocnienia przebiegu szlaku.

B. Hamowanie reakcji Y → Z przez Z na zasadzie sprzężenia zwrotnego wpływa na produkcję Z. Jednakże, jak wynika z przedstawionego schematu, szybkość powstawania X i Y nie zmienia się, chociaż oba przestają być potrzebne. Taki szlak jest dlatego mniej skuteczny niż przedstawiony na rys. 5-32.

C. Jeśli Z stymuluje etap B → X, wtedy zwiększenie ilości Z prowadzić będzie do zwiększonego przekształcania B w X, co z kolei spowoduje zwiększenie syntezy Z. Doprowadzi to do wzmocnienia podobnego do opisanego w części (A).

D. Jeśli Z stymuluje etap B → C, wtedy nagromadzenie Z prowadzi do zmiany reakcji w kierunku syntezy C. Jest to druga z możliwości, obok przedstawionej na rysunku, zrównoważenia podziału składników między dwie gałęzie analizowanego szlaku.

Odpowiedź 5-9. Zarówno wiązanie nukleotydów, jak i fosforylacja może indukować w białku zmiany allosteryczne. Zmiany te mogą mieć wielorakie skutki, takie jak zmiana aktywności

enzymu, zasadnicza zmiana struktury przestrzennej lub zmiana powinowactwa względem innych białek i małych cząsteczek. Obydwa mechanizmy są zasadniczo uniwersalne. Zaletą wiązania nukleotydów jest duża szybkość dyfuzji ich małych cząsteczek do białka; na przykład zmiany struktury przestrzennej towarzyszące działaniu białek motorycznych wymagają szybkiej wymiany nukleotydów. Jeśli różne stany konformacyjne białek motorycznych byłyby kontrolowane przez fosforylację, kinaza białkowa albo musiałaby w każdym etapie dyfundować do odpowiedniego położenia, co jest procesem znacznie wolniejszym, albo musiałaby być trwale związana z motorem. Zaletą fosforylacji jest natomiast to, że wymaga ona tylko jednej reszty aminokwasowej na powierzchni białka, a nie specyficznego miejsca wiązania. Tym sposobem fosforany mogą być przyłączane do wielu różnych łańcuchów bocznych tego samego białka (jeśli istnieją kinazy białkowe o odpowiedniej specyficzności), co prowadzi do znacznego zwiększenia możliwości regulacji tego białka.

Odpowiedź 5-10. Pracując w kompleksie wszystkie trzy białka przyczyniają się do specyficzności (przez bezpośrednie wiązanie sejfu i klucza), wzajemnie zapewniają sobie odpowiednie położenie i wzmacniając się nawzajem mechanicznie wykonują zadanie, którego nie mogłyby zrealizować pracując oddzielnie (na przykład dwie podjednostki trzymają klucz). Co więcej, ich działanie jest skoordynowane w czasie (na przykład wiązanie ATP przez jedną podjednostkę wymaga prawdopodobnie hydrolizy ATP do ADP zachodzącej na drugiej podjednostce).

Odpowiedź 5-11

A. Prawdziwe. Tylko kilka łańcuchów bocznych aminokwasów tworzy miejsce aktywne. Reszta białka jest niezbędna do utrzymania łańcucha polipeptydowego w odpowiednim ułożeniu, tworzy dodatkowe miejsca wiążące, które służą do regulacji, i zapewnia prawidłowe umiejscowienie białka w komórce.

B. Prawdziwe. Niektóre enzymy tworzą przejściowe połączenia kowalencyjne z substratem (patrz rys. 4-5), jednakże we wszystkich przypadkach po zakończeniu reakcji enzym powraca do wyjściowej struktury.

C. Nieprawdziwe. Harmonijka β może zawierać w zasadzie dowolną liczbę nici, ponieważ dwie nici tworzące zrąb harmonijki mogą tworzyć wiązania wodorowe z kolejnymi nićmi. (Harmonijki β w znanych białkach zawierają od 2 do 16 nici).

D. Nieprawdziwe. Prawdą jest, że specyficzność cząsteczki przeciwciała związana jest wyłącznie z pętlami na jej powierzchni, jednakże pętle te należą do domen pofałdowanego łańcucha lekkiego i ciężkiego (patrz rys. 5-25).

E. Nieprawdziwe. Enzymy nie zmieniają punktu równowagi katalizowanej reakcji.

F. Nieprawdziwe. Liczba możliwych ułożeń aminokwasów w sekwencji liniowej zdolnych do utworzenia stabilnie pofałdowanej domeny białka jest tak niewielka, że większość nowych białek powstaje poprzez zmiany w białkach już istniejących.

G. Nieprawdziwe. K_M enzymu jest miarą jego powinowactwa względem substratu, a nie szybkości reakcji katalizowanej przez ten enzym.

H. Prawdziwe. Enzymy allosteryczne wiążą zwykle jedną lub więcej cząsteczek działających jako regulatory w miejscach odrębnych od miejsca aktywnego.

I. Nieprawdziwe. Wiązania niekowalencyjne stabilizują strukturę przestrzenną makroczasteczek.

J. Nieprawdziwe. Chromatografia powinowactwa pozwala rozdzielać cząsteczki na podstawie ich oddziaływania ze specyficznym ligandem, a nie ich ładunku wypadkowego.

K. Nieprawdziwe. Im większa organella, tym większej sile odśrodkowej podlega i szybciej sedymentuje, pomimo zwiększonego tarcia podczas ruchu przez otaczający roztwór.

Odpowiedź 5-12. W α helisie i położonych centralnie niciach harmonijki β wszystkie wiązania peptydowe uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych. Dzięki temu wymienione struktury uzyskują znaczną stabilność i mogą być tworzone przez różne sekwencje aminokwasowe.

Odpowiedź 5-13. Ponieważ enzymy są katalizatorami, reakcje enzymatyczne muszą być termodynamicznie możliwe; enzym jedynie obniża energię aktywacji, która przy braku enzymu stanowi barierę odpowiedzialną za zwolnienie przebiegu reakcji. Natomiast wysoka temperatura dostarcza substratom energii kinetycznej, co umożliwia większej liczbie cząsteczek pokonanie bariery energii aktywacji. Jednakże w przypadku wielu substratów istnieje wiele możliwych sposobów reagowania i wszystkie one są wzmacniane przez podwyższenie temperatury, podczas gdy enzym zapewnia selektywność i ułatwia przebieg określonego sposobu reagowania, co — jako korzystne dla komórki — utrwaliło się w toku ewolucji. Tak więc działania enzymu nie można zastąpić podniesieniem temperatury. Dlatego też zbawienne działanie rosołu jest skutkiem innych mechanizmów, które nadal pozostają niewyjaśnione.

Odpowiedź 5-14. Nie. Białko to nie będzie miało takiej samej, ani nawet podobnej struktury przestrzennej, ponieważ wiązanie peptydowe jest spolaryzowane. Rozpatrując dwa aminokwasy połączone w łańcuchu polipeptydowym wiązaniem peptydowym, można stwierdzić, że aminokwas bliższy końca aminowego dostarcza grupę karboksylową, a drugi aminokwas grupę aminową. Odwrócenie kolejności ich ułożenia zmieni położenie ich łańcuchów bocznych względem szkieletu polipeptydowego, co spowoduje zmianę ich środowiska chemicznego.

Odpowiedź 5-15. Ponieważ na jeden obrót α helisy przypada 3,6 reszt aminokwasowych, rozpatrywana sekwencja 14 aminokwasów utworzy helisę o niemal 4 pełnych skrętach. W helisie tej aminokwasy polarne i hydrofobowe będą rozdzielone w ten sposób, że wszystkie reszty polarne znajdą się po jej jednej stronie, a hydrofobowe po drugiej. Powstanie więc amfipatyczna α helisa, która prawdopodobnie będzie eksponowana na powierzchni białka, przy czym jej strona hydrofobowa zostanie skierowana do jego wnętrza. Co więcej, dwie helisy tego typu mogą zwinąć się razem w sposób przedstawiony na rys. 5-11.

Odpowiedź 5-16

A. „ES" oznacza kompleks enzymu z substratem.

B. Postaci wolne i związane enzymu oraz substratu znajdują się w stanie równowagi; cząsteczka substratu po związaniu z enzymem może ulec dysocjacji (stąd dwukierunkowe strzałki) lub zostać przekształcona w produkt. To przekształcanie

substratu w produkt (czemu towarzyszy uwolnienie energii swobodnej) jest reakcją w zasadzie nieodwracalną, co obrazuje strzałka jednokierunkowa.

C. Enzym jest katalizatorem i dlatego jest uwalniany po reakcji w postaci niezmienionej; dlatego „E" pojawia się na obu końcach równania.

D. Produkty reakcji często przypominają substraty do tego stopnia, że mogą także wiązać się z enzymem. Cząsteczki enzymu związane z produktem (czyli kompleksy EP) nie mogą prowadzić katalizy; dlatego też nadmiar produktu hamuje reakcję zmniejszając stężenie wolnej postaci enzymu.

E. Związek X jest inhibitorem reakcji działającym przez tworzenie kompleksów EX. Ponieważ P musi powstać zanim zahamuje reakcję, działa wolniej niż X, który jest obecny od początku reakcji.

Odpowiedź 5-17. Aminokwasy polarne: Ser, Ser-P, Lys, Gln, His i Glu znajdą się prawdopodobnie na powierzchni białka, a aminokwasy hydrofobowe: Leu, Phe, Val, Ile i Met w jego wnętrzu. Utlenienie dwóch reszt cysteiny, prowadzące do powstania wiązania dwusiarczkowego, znosi ich zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, co sprawia, że stają się one bardziej hydrofobowe. Mostki dwusiarczkowe występują z reguły we wnętrzu białka. Niezależnie od właściwości łańcuchów bocznych, każdy z aminokwasów położonych na końcu aminowym i karboksylowym zawiera grupę obdarzoną ładunkiem. Są to grupa aminowa i karboksylowa, stanowiące znaczniki końców łańcucha polipeptydowego. Ze względu na obecność ładunku występują one zazwyczaj na powierzchni białka.

Odpowiedź 5-18. Różne formy struktury drugorzędowej nie są stabilne w odizolowaniu i wymagają stabilizującej obecności innych części łańcucha polipeptydowego. Gdyby rejony hydrofobowe, normalnie ukrywane we wnętrzu pofałdowanej domeny, znalazły się na zewnątrz, łączyłyby się ze sobą niespecyficznie ze względu na niekorzystną energetycznie obecność tych rejonów w roztworze wodnym. W związku z tym fragmenty takie nie miałyby określonej struktury przestrzennej i nie byłyby zdolne do wiązania liganda, nawet jeśli zawierałyby wszystkie aminokwasy normalnie tworzące miejsce wiążące ligand. Natomiast *domena* białka stanowi jednostkę pofałdowania, a fragmenty łańcucha polipeptydowego odpowiadające całej domenie zazwyczaj zwijają się prawidłowo. Stąd wyizolowane domeny białka często zachowują aktywność, taką jak wiązanie liganda, jeśli miejsce wiążące ligand zawarte jest całkowicie w obrębie danej domeny. Dlatego też najbardziej prawdopodobnym miejscem przerwania łańcucha polipeptydowego białka z rys. 5-12, które umożliwiłoby powstanie stabilnych podjednostek, jest granica między dwiema domenami (czyli pętla między dwiema α helisami położonymi po prawej stronie na dole przedstawionej struktury).

Odpowiedź 5-19. Termiczna inaktywacja enzymu sugeruje, że mutacja prowadzi do osłabienia stabilności struktury białka. Na przykład wiązanie wodorowe tworzące się między łańcuchami bocznymi dwóch aminokwasów nie może powstać, ponieważ mutacja doprowadziła do zastąpienia jednego z nich innym, niezdolnym do uczestniczenia w tym wiązaniu. Brak wiązania ułatwiającego utrzymanie prawidłowo zwiniętego łańcucha polipeptydowego powoduje rozfałdowanie białka w temperaturze, w której normalnie pozostaje stabilne. Łańcuchy polipeptydowe ulegające denaturacji w podwyższonej temperaturze często tworzą agregaty i po obniżeniu temperatury rzadko zwijają się w aktywne białka.

Odpowiedź 5-20. Stężenie substratu jest równe 1 mM. Wartość tę można uzyskać przez podstawienie danych do równania, ale prostszym podejściem jest wykorzystanie faktu, że wymagana szybkość (50 μM/s) jest dokładnie równa połowie szybkości maksymalnej V_{max}, w których to warunkach stężenie substratu jest równe K_M. Oba wykresy przedstawiono na rys. O5-20 (*poniżej*). Wykres zależności 1/szybkość od 1/S jest linią prostą, ponieważ przekształcenie wyjściowego równania prowadzi do równania przedstawionego w pytaniu 5-22B.

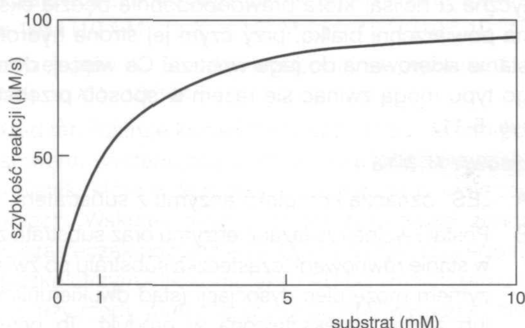
Odpowiedź 5-21. Jeżeli S jest dużo mniejsze od K_M, to miejsce aktywne enzymu jest w większości *niezajęte*. Jeśli S jest dużo większe niż K_M, to szybkość reakcji jest ograniczona stężeniem *enzymu* (ponieważ większość miejsc katalitycznych jest zajęta).

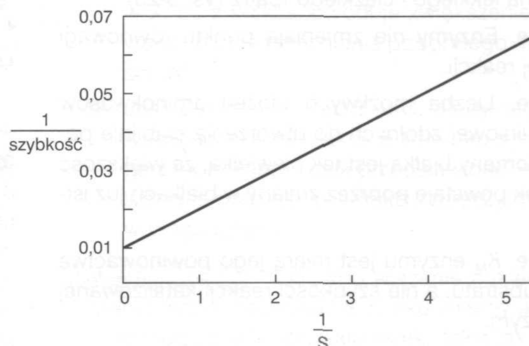
Odpowiedź 5-22.

A i B. Dane w ramkach wykorzystano do wykonania wykresów — *czerwona* krzywa i *czerwona* linia prosta na rys. O5-22, (*sąsiednia strona*). Wartość K_M = 1 μM, a V_{max} = 2 μM/min. Zauważ, że dużo łatwiej jest wyznaczyć te wielkości z wykresu liniowego, ponieważ krzywa (A) tylko zbliża się do wartości V_{max}.

C. Powstawanie nieznacznej ilości produktu jest istotne, ponieważ akumulacja produktu i równoczesne ubywanie sub-

Rys. O5-20





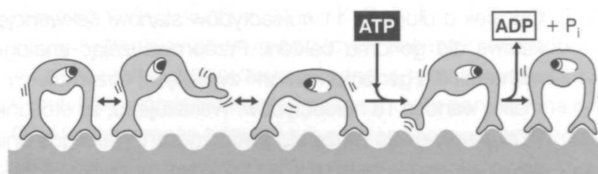
stratu doprowadziłyby do zmniejszenia szybkości reakcji. W tych warunkach wyznaczona prędkość byłaby mniejsza od realnie występującej.

D. Wzrost K_M oznacza, że stężenie substratu niezbędne dla uzyskania szybkości równej połowie szybkości maksymalnej również wzrasta. Ponieważ większa ilość substratu jest potrzebna dla uzyskania tej samej szybkości, reakcja katalizowana przez enzym jest hamowana przez jego fosforylację. Dane dla enzymu fosforylowanego przedstawiono na rys. A5-22, *poniżej*, w postaci *zielonej* krzywej i *zielonej* linii prostej.

Odpowiedź 5-23. Wszystkie reakcje są odwracalne. Jeśli związek AB *może rozpadać się do A i B, równie prawdopodobne* powinno być połączenie się A i B i utworzenie związku AB. Przewaga jednej z tych reakcji zależy od stałej równowagi i stężeń A, B i AB (jak przedstawiono na rys. 5-26). Przypuszczalnie aktywność wyizolowanego enzymu wyznaczono mierząc ilość powstałego AB w obecności stosunkowo dużych ilości A i B. Możemy jednakże założyć, że w komórce występuje duże stężenie AB i w tych warunkach enzym katalizuje reakcje AB → A + B. (Pytanie to oparto na prawdziwym zdarzeniu; dla enzymu wyizolowanego i nazwanego na podstawie reakcji *prowadzonej w jednym kierunku stwierdzono później możliwość* prowadzenia w komórce reakcji w odwrotnym kierunku).

Odpowiedź 5-24. Białko motoryczne przedstawione na ilustracji może poruszać się z równą łatwością w lewo i w prawo, nie jest więc zdolne do dłuższego poruszania się w jednym kierunku. Jednakże sprzężenie jednego z etapów z hydrolizą ATP (np. uzależnienie odłączenia jednej ze stóp od związania ATP i sprzężenie ponownego jej przyłączenia z hydrolizą związanego ATP) umożliwi białku ruch w jednym kierunku, przy czym będzie on wymagać ciągłego zużywania ATP. Zauważ, że *w zasadzie nie ma znaczenia, który etap zostanie sprzężony* z hydrolizą ATP (rys. O5-24).

Odpowiedź 5-25. Mniejsza szybkość migracji małych cząsteczek przez kolumnę z nośnikiem do filtracji żelowej wynika z tego, że mniejsze cząsteczki mają dostęp do znacznie większych przestrzeni w obrębie porowatych ziaren nośnika niż cząsteczki większe. Jednakże dyfuzja mniejszych cząsteczek przez przestrzeń w obrębie ziaren wymaga czasu. Przy bardzo dużej szybkości przepływu wszystkie cząsteczki będą poruszały się szybko, omijając wnętrza ziaren, co spowoduje, że małe i duże cząsteczki będą równocześnie wypływały z kolumny.



Rys. O5-24

Rozdział 6

Odpowiedź 6-1

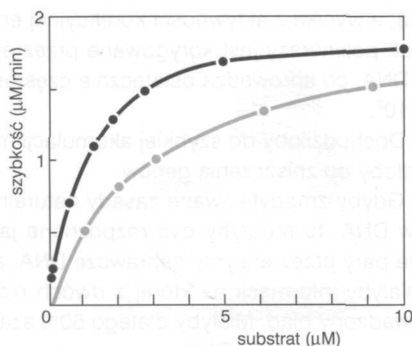
A. Komplementarny łańcuch ma sekwencję:
5'-TGATTGTGGACAAAAATCC-3'.
Komplementarne łańcuchy mają przeciwną polarność i zgodnie z przyjętą konwencją sekwencję odcinka DNA zapisuje się w formie pojedynczej nici w kierunku od końca 5' do 3'.

B. DNA jest zbudowany z czterech rodzajów nukleotydów (100% = 13% A + *x*% T + *y*% G + *z*% C). Ponieważ A tworzy parę z T, obydwa nukleotydy występują w ilościach równomolarnych, czyli DNA zawiera 13% T. Oznacza to, że pary G·C stanowią 74% [= 100% – (13% +13%)] całości. Każda para zasad zawiera równomolarne ich ilości, a więc $y = z = 74/2 = 37\%$.

C. Jednoniciowa cząsteczka DNA zbudowana z *N* nukleotydów może mieć 4^N kombinacji sekwencji, ale obliczenie ilości możliwych cząsteczek dwuniciowych jest bardziej skomplikowane. Wiele spośród 4^N jednoniciowych sekwencji będzie stanowiło odcinki komplementarne do innych możliwych sekwencji; na przykład 5'-AGTCC-3' oraz 5'-GGACT-3' tworzą taką samą strukturę dwuniciową i dlatego liczą się w niej jako jedna możliwość. Jeśli *N* jest liczbą nieparzystą, to każda jednoniciowa sekwencja będzie komplementarna do jednej z możliwych, tak więc ilość dwuniciowych cząsteczek wyniesie $0{,}5 \cdot 4^N$. Jeśli *N* jest liczbą parzystą, to wynik będzie większy, ponieważ niektóre sekwencje (takie jak 5'-ACTAGT-3') będą samokomplementarne. Ilość kombinacji w tym przypadku wynosi: $0{,}5 \cdot 4^N + 0{,}5 \cdot 4^{N/2}$.

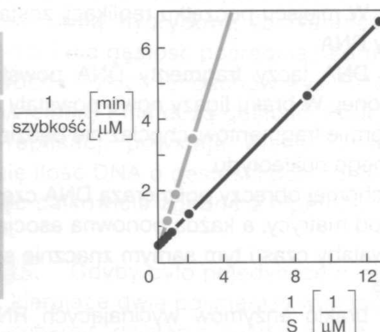
D. Żeby określić odcinek o unikatowej sekwencji w cząsteczce o długości *N* nukleotydów, 4^N musi być większe niż $3 \cdot 10^6$. Tak więc rozwiązanie $4^N > 3 \cdot 10^6$ daje $N > \ln(3 \cdot 10^6) / \ln 4 = 10{,}7$.

Rys. O5-22



DANE DLA CZĘŚCI A i B

S (μM)	$\frac{1}{S}\left[\frac{1}{\mu M}\right]$	szybkość (μM/min)	$\frac{1}{\text{szybkość}}\left[\frac{\text{min}}{\mu M}\right]$
0,08	12,50	0,15	6,7
0,12	8,30	0,21	4,8
0,54	1,85	0,70	1,4
1,23	0,81	1,1	0,91
1,82	0,56	1,3	0,77
2,72	0,37	1,5	0,67
4,94	0,20	1,7	0,59
10,00	0,10	1,8	0,56



Odcinek o długości 11 nukleotydów stanowi sekwencję unikatową dla genomu bakterii. Przeprowadzając analogiczny rachunek dla genomu komórki zwierzęcej otrzymujemy minimalną wartość 16 nukleotydów. Wskazuje to, że stosunkowo krótka sekwencja może stanowić znacznik jakiegoś unikatowego miejsca w genomie, na przykład może stanowić „metkę" określonego genu.

Odpowiedź 6-2

A. Odległość pomiędzy widełkami replikacyjnymi #4 i #5 wynosi około 280 nm, co odpowiada 824 nukleotydom (= 280/0,34) Widełki te zderzyłyby się w ciągu ok. 8 sekund. Widełki #7 i #8 oddalają się od siebie — między nimi nigdy nie doszłoby do zderzenia.

B. Całkowita długość DNA pokazanego na mikrografii wynosi ok. 1,5 μm, co odpowiada łańcuchowi zawierającemu 4400 nukleotydów. Stanowi to zaledwie 0,002% całkowitego DNA w komórce muchy. Obliczenie: $[(4400/(1{,}8 \cdot 10^8)] \cdot 100\%$.

Odpowiedź 6-3. Gdyby stary łańcuch był naprawiany z wykorzystaniem łańcucha nowego jako matrycy, to błąd zawarty w tym ostatnim stałby się trwałą mutacją w genomie. W procesie tym stara informacja zostałaby wymazana. Gdyby enzymy naprawcze nie odróżniały nowego łańcucha od starego, to istniałoby tylko 50% szans na naprawę jakiegokolwiek błędu replikacyjnego.

Odpowiedź 6-4. Podczas syntezy startera RNA nie działa system korekty błędów. Aby rozpocząć nowy starter, jego pierwszy nukleotyd trzeba dopasować do matrycy, do niego należy przyłączyć drugi, do drugiego trzeci itd. Nawet jeśliby te pierwsze nukleotydy były doskonale dopasowane do matrycy, to jednak krótkie nukleotydy wiążą się z niewielkim powinowactwem i w konsekwencji odróżnienie poprawnych par zasad od niepoprawnych przez jakąkolwiek hipotetyczną aktywność korekcyjną byłoby niemożliwe. Zadaniem prymazy jest dlatego „zrobienie czegokolwiek, co może rozsądnie wiązać się z matrycą, bez nadmiernej troski o precyzję". Później sekwencje te są usuwane i zastępowane sekwencjami DNA, w których syntezie polimeraza DNA wykorzystuje jako startery fragmenty Okazaki utworzone wcześniej i dokładnie sprawdzone przez mechanizmy korekty. Polimeraza jest w o tyle korzystniejszej sytuacji niż prymaza, że nie musi rozpoczynać nowego łańcucha, tylko dołączać nukleotydy do już istniejącego. Nowo dołączany nukleotyd jest dzięki temu ściśle utrzymywany we właściwym miejscu i enzym może sprawdzić, czy nukleotyd ten utworzył poprawną parę z nukleotydem w matrycy i ewentualnie dokonać korekty.

Odpowiedź 6-5

A. Bez polimerazy DNA replikacja w ogóle nie może się odbywać. W miejscu początku replikacji zostaną utworzone startery RNA.

B. Ligaza DNA łączy fragmenty DNA powstające na nici opóźnionej. W braku ligazy nowo powstały DNA pozostanie w formie fragmentów, chociaż nie będzie mu brakowało żadnego nukleotydu.

C. Bez ruchomej obręczy polimeraza DNA często odłączałaby się od matrycy, a każda ponowna asocjacja z matrycą zajmowałaby czas i tym samym znacznie spowalniała replikację.

D. Gdyby brakło enzymów wycinających RNA, fragmenty RNA pozostawałyby kowalencyjnie złączone z nowo replikowanym DNA. Nie dochodziłoby do ligacji, ponieważ ligaza DNA nie może łączyć RNA z DNA. Nić opóźniona składałaby się z fragmentów zarówno DNA jak i RNA.

E. Bez helikazy polimeraza DNA ulegnie zatrzymaniu, ponieważ nie potrafi rozplatać przed sobą dwuniciowej helisy DNA. Powstałoby bardzo niewiele nowego DNA.

F. Bez prymazy nie mogą powstać startery RNA ani na nici wiodącej, ani na opóźnionej. Replikacja DNA nie może się rozpocząć.

Odpowiedź 6-6. Uszkodzenia DNA spowodowane reakcjami deaminacji i depurynacji zachodzą spontanicznie. Nie są one rezultatem replikacji i dlatego z jednakowym prawdopodobieństwem dotyczą obu nici DNA. Gdyby enzymy naprawcze rozpoznawały tego rodzaju uszkodzenia tylko na nici nowo syntetyzowanej, to połowa takich uszkodzeń pozostałaby nie naprawiona. Twierdzenie jest więc nieprawdziwe.

Odpowiedź 6-7. Pytanie jest błędnie sformułowane. Nie można przekształcać jednego gatunku w drugi przez proste wprowadzenie 1% przypadkowych mutacji do jego genomu. Jest niemożliwe, żeby 5000 mutacji powstających codziennie wskutek braku naprawy DNA, zachodziło dokładnie w tych miejscach DNA, w których genom człowieka różni się od genomu szympansa. Jest też bardzo prawdopodobne, że w rezultacie tak dużej częstości mutacji wiele istotnych genów uległoby inaktywacji, prowadząc do śmierci komórki. Ciało człowieka jest zbudowane z około 10^{13} komórek. Aby zamienić się w szympansa, nie jedna, ale bardzo dużo komórek musiałoby ulec zmianie. Ponadto, gdyby nawet doszło do zmiany wielu komórek, musiałyby one zajść w odpowiednim okresie rozwojowym, wpływającym na plan konstrukcji całego ciała, na przykład na to, czy zawiera ono ogon, czy nie.

Odpowiedź 6-8

A. Nieprawdziwe. Polarność łańcucha DNA odnosi się do zwrotu jego rdzenia cukrowo-fosforanowego.

B. Nieprawdziwe. Syntezę DNA na nici wiodącej i nici opóźnionej katalizują cząsteczki identycznej polimerazy DNA. Widełki replikacyjne są asymetryczne, ponieważ nić opóźniona jest syntetyzowana w postaci fragmentów ulegających następnie połączeniu.

C. Prawdziwe. Pary G·C są stabilizowane trzema wiązaniami wodorowymi, podczas gdy pary A·T tylko dwoma.

D. Nieprawdziwe. Nukleaza RNA usuwa startery RNA. Fragmenty Okazaki są odcinkami nowo syntetyzowanego DNA, które następnie ulegają połączeniu tworząc nową nić opóźnioną.

E. Prawdziwe. Polimeraza DNA popełnia jedną pomyłkę na 10^7 wprowadzanych nukleotydów, co jest wartością uderzająco małą, a wynika z aktywności korekcyjnej enzymu. 99% pomyłek polimerazy jest korygowane przez enzymy naprawcze DNA, co sprowadza ostatecznie częstość błędu do 1 na 10^9.

F. Prawdziwe. Dochodziłoby do szybkiej akumulacji mutacji, co prowadziłoby do zniszczenia genów.

G. Prawdziwe. Gdyby zmodyfikowane zasady naturalnie występowały w DNA, to mogłyby być rozpoznane jako źle dopasowane pary przez enzymy naprawcze DNA, ale enzymy nie miałyby informacji na której z dwóch nici DNA został wprowadzony błąd. Miałyby dlatego 50% szans naprawy właściwego łańcucha DNA.

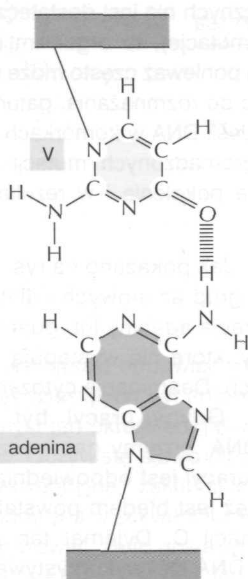
H. Prawdziwe. Aby przekształcić normalną komórkę w komórkę nowotworową, zwykle musi zakumulować się wiele specyficznych mutacji. Mutacja w genie kodującym enzym naprawczy DNA może czynić komórkę bardziej podatną na akumulację dalszych mutacji, tym samym przyśpieszając powstawanie raka.

Odpowiedź 6-9. Gdyby podczas replikacji DNA często były wprowadzane nieodpowiednie zasady, to informacja genetyczna nie byłaby poprawnie dziedziczona. Życie nie mogłoby istnieć. Chociaż zasady mogą tworzyć pary związane wiązaniami wodorowymi, tak jak przedstawia rysunek P6-9, jednak takie pary nie pasują do struktury dwuniciowej helisy. Kąt, pod którym reszta A występującá w parze A·C łączy się z rdzeniem cukrowo-fosforanowym, bardzo mocno różni się od kąta tworzonego przez A występującą w standardowej parze A·T. W przypadku pary A·G znacznie wzrasta odległość między łańcuchami cukrowo-fosforanowymi, co wynika z obecności dwóch dużych reszt purynowych w tej parze. W konsekwencji wprowadzenie błędnych zasad do łańcucha DNA jest energetycznie niekorzystne i błędy takie występują tylko bardzo rzadko.

Odpowiedź 6-10

A. Zasady V, W, X i Y mogą tworzyć cząsteczkę dwuniciowej helisy podobną do DNA, o właściwościach praktycznie identycznych z właściwościami prawdziwego DNA. V tworzyłaby zawsze parę z X, a W z Y. Makrocząsteczka taka mogłaby pochodzić z żywego organizmu, wykorzystującego te same reguły replikacji genomu co organizmy ziemskie. Zasady takie jak V, W, X i Y mogłyby zostać wyselekcjonowane podczas ewolucji jako jednostki monomeryczne także i ziemskiego DNA (podobnie jak istnieje dużo więcej możliwych aminokwasów niż zestaw dwudziestu wyselekcjonowanych w *toku ewolucji*, z których *obecnie* składają się białka).

B. Żadna z zasad V, W, X ani Y nie może zastąpić A, T, G lub C. Aby zachować stałą odległość między dwoma łańcuchami cukrowo-fosforanowymi, w dwuniciowej helisie pirymidyna zawsze musi tworzyć parę z puryną (patrz np. pytanie 6-1). Ośmioma potencjalnie możliwymi kombinacjami są V·A, V·G, W·A, W·G, X·C, X·T, Y·C oraz Y·T. Ze względu na pozycje grup będących akceptorami i donorami w wiązaniu wodorowym, żadna z tych kombinacji nie tworzyłaby stabilnej pary, jak pokazano dla pary V·A na rys. O6-10, która może tworzyć tylko jedno wiązanie wodorowe.



Rys. O6-10

Odpowiedź 6-11. Ponieważ dwa łańcuchy są utrzymywane razem przez wiązania wodorowe między zasadami, stabilność helisy w dużym stopniu zależy od liczby wiązań wodorowych, które mogą się utworzyć w danej cząsteczce. Dlatego też stabilność cząsteczki DNA określają dwa parametry: liczba par zasad oraz liczba wiązań wodorowych tworzonych przez każdą parę. Jak pokazano na rys. 6-5, para A·T tworzy dwa wiązania wodorowe, podczas gdy para G·C trzy. Helisa C, zawierająca ogółem 34 wiązania wodorowe, stopi się w najniższej temperaturze, helisa B (zawiera 65 wiązań wodorowych) ulega stopieniu w następnej kolejności, a helisa A (78 wiązań wodorowych) jest najbardziej stabilna, głównie w wyniku dużej zawartości par G·C. Istotnie organizmy żyjące w środowisku o wysokiej temperaturze, takie jak bakterie zasiedlające okolice gejzerów, wykazują niezwykle dużą zawartość par G·C.

Odpowiedź 6-12. Współczynnik powiększenia DNA wynosiłby $2{,}5 \cdot 10^6$ [$= (5 \cdot 10^{-3}) : (2 \cdot 10^{-9}$ m)]. Tak więc „kabel" DNA miałby długość 2500 km. Odległość ta w przybliżeniu jest równa odległości pomiędzy Londynem a Istambułem, San Francisco a Kansas City lub Melbourne a Cairns. Odległość między sąsiednimi parami zasad wynosiłaby 0,85 mm, co odpowiada grubości 12 kartek tej książki. Gen zbudowany z 1000 nukleotydów miałby długość 85 cm.

Odpowiedź 6-13.

A. Jedną parę zasad opisują dwa bity (na przykład w matematycznym kodzie dwójkowym wartości 00, 01, 10 i 11 opisywałyby cztery różne pary nukleotydów).

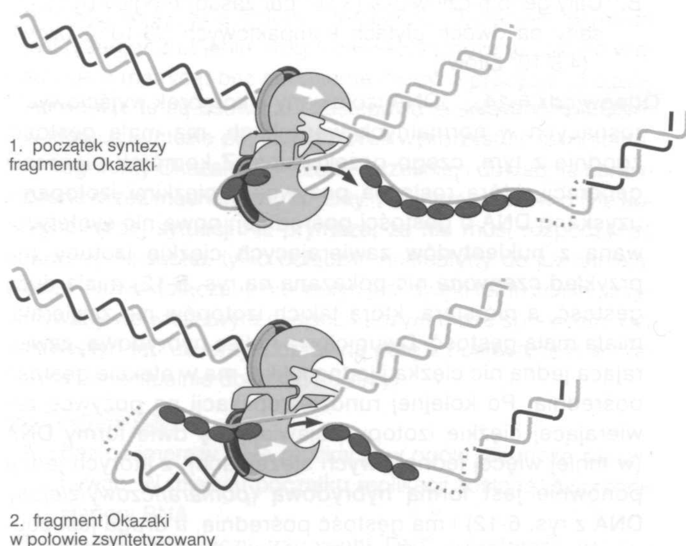
B. Cały genom człowieka ($3 \cdot 10^9$ par zasad) mógłby być zapisany na dwóch płytach kompaktowych [$(3 \cdot 10^9 \cdot 2$ bitów) : $(4{,}8 \cdot 10^9$ bitów)]

Odpowiedź 6-14. DNA izolowany z komórek wyjściowych, rosnących w normalnych warunkach, ma małą gęstość, zgodnie z tym, czego oczekiwałeś. Z komórek pierwszej generacji, która rosła na pożywce z ciężkimi izotopami, uzyskano DNA o gęstości pośredniej: nowa nić syntetyzowana z nukleotydów zawierających ciężkie izotopy (na przykład *czerwona* nić pokazana na rys. 6-12) miała dużą gęstość, a nić stara, która takich izotopów nie zawierała, miała małą gęstość. Dwuniciowa helisa hybrydowa, zawierająca jedną nic ciężką i jedną lekką, ma w efekcie gęstość pośrednią. Po kolejnej rundzie replikacji na pożywce zawierającej ciężkie izotopy pojawiają się dwie formy DNA (w mniej więcej jednakowych stężeniach), z których jedna ponownie jest formą hybrydową *(pomarańczowy/zielony* DNA z rys. 6-12) i ma gęstość pośrednią, a druga jest zbudowana z dwóch ciężkich łańcuchów (rys. 6-12, cząsteczka *czerwono/zielona*) i ma dużą gęstość. Podczas następnych rund replikacji powstaje więcej ciężkiego DNA i zmniejsza się ilość DNA o gęstości pośredniej. Uzyskane wyniki są więc całkowicie zgodne z hipotezą, którą testowałeś.

Odpowiedź 6-15. Gdyby było pojedyncze miejsce początku replikacji, kierujące dwie polimerazy w przeciwnych kierunkach, a szybkość działania każdej z nich wynosiłaby

100 nukleotydów na sekundę, liczba nukleotydów zreplikowanych w ciągu 24 godz. wynosiłaby $1{,}73 \cdot 10^7$ ($= 2 \cdot 100 \cdot 24 \cdot 60 \cdot 60$). Aby w tym czasie zreplikować cały genom, potrzeba byłoby co najmniej 348 ($= 6 \cdot 10^9/1{,}73 \cdot 10^7$) *miejsc początku replikacji. Oszacowana dla genomu człowieka* liczba miejsc początku replikacji (10 000) jest więc więcej niż wystarczająca.

Odpowiedź 6-16. Związek A jest trifosforanem dideoksycytydyny (ddCTP), identycznym z dCTP, z wyjątkiem braku grupy 3'-hydroksylowej w reszcie deoksyrybozy. Polimeraza DNA rozpoznaje ddCTP jako dCTP i wprowadza go do łańcucha DNA. Dołączenie takiego nukleotydu do rosnącego łańcucha powoduje powstanie „martwego" końca, ponieważ brak w nim grupy 3' —OH. Jeśli do mieszaniny inkubacyjnej zostanie wprowadzony ddCTP w dużym nadmiarze, to synteza DNA będzie przebiegała tylko do tego momentu, kiedy polimeraza napotka G na nici matrycowej (nukleotyd komplementarny do C). W tym miejscu zamiast dCTP zostanie wprowadzona ddCTP i dalsze wydłużanie łańcucha nie będzie możliwe. Jeśli ddCTP będzie dodana w ilości stanowiącej 10% ilości dCTP dostępnej w reakcji, to istnieje szansa* 1 na 10, że nukleotyd ten zostanie włączony do DNA gdziekolwiek, gdzie na nici matrycowej pojawi się G. Dzięki temu zostanie zsyntetyzowana cała populacja fragmentów DNA i z ich długości można wydedukować, gdzie znajdują się reszty G na nici matrycowej. Stanowi to podstawę metod stosowanych do określania sekwencji nukleotydów w jakimś odcinku DNA (dyskusję tego zagadnienia przedstawiono w rozdz. 10).



Rys. O6-18

* Zakładamy, że dCTP i ddCTP mają jednakowe powinowactwo do polimerazy DNA. W rzeczywistości powinowactwo ddCTP do polimerazy DNA jest mniejsze niż dCTP (podobnie jak i pozostałych dideoksyanalogów normalnych substratów) i sekwencjonując DNA stosuje się nadmiar trifosforanów dideoksynukleozydów w stosunku do trifosforanów deoksynukleozydów (*przyp. tłum.*).

To samo zjawisko chemiczne wykorzystano w przypadku leku o nazwie *cortisiepin*, stosowanego do zwalczania AIDS u pacjentów zainfekowanych HIV. Cortisiepin jest w komórkach przekształcany w ddCTP i blokuje replikację DNA i syntezę *wirusa. Ponieważ lek ten nie jest selektywny w stosunku* do wirusowego DNA, ale wpływa na replikację i naprawę całego komórkowego DNA, jego stosowanie ma poważne szkodliwe działanie uboczne.

Związek B jest monofosforanem dideoksycytydyny (ddCMP), któremu brak grupy trifosforanowej w pozycji 5' oraz grupy hydroksylowej w pozycji 3'. Nie może on dostarczyć energii niezbędnej do polimeryzacji i dlatego nie zostanie wbudowany do DNA. Nie wpływa na replikację DNA.

Odpowiedź 6-17. Aby wykorzystać energię hydrolizy grupy 3'-trifosforanowej do napędzania polimeryzacji, łańcuch musiałby rosnąć w kierunku od końca 3' do końca 5', to jest odwrotnie niż w normalnych organizmach. Sprawdzanie poprawności produktu wymagałoby aktywności 5' → 3' nukleazowej. Scenariusz opisujący ten proces w hipotetycznym organizmie byłby taki, jak przedstawiono na rys. 6-19, z wyjątkiem tego, że wszystkie grupy fosforanowe byłyby po prawej stronie struktur DNA, a trifosforanowe po prawej stronie nukleotydów.

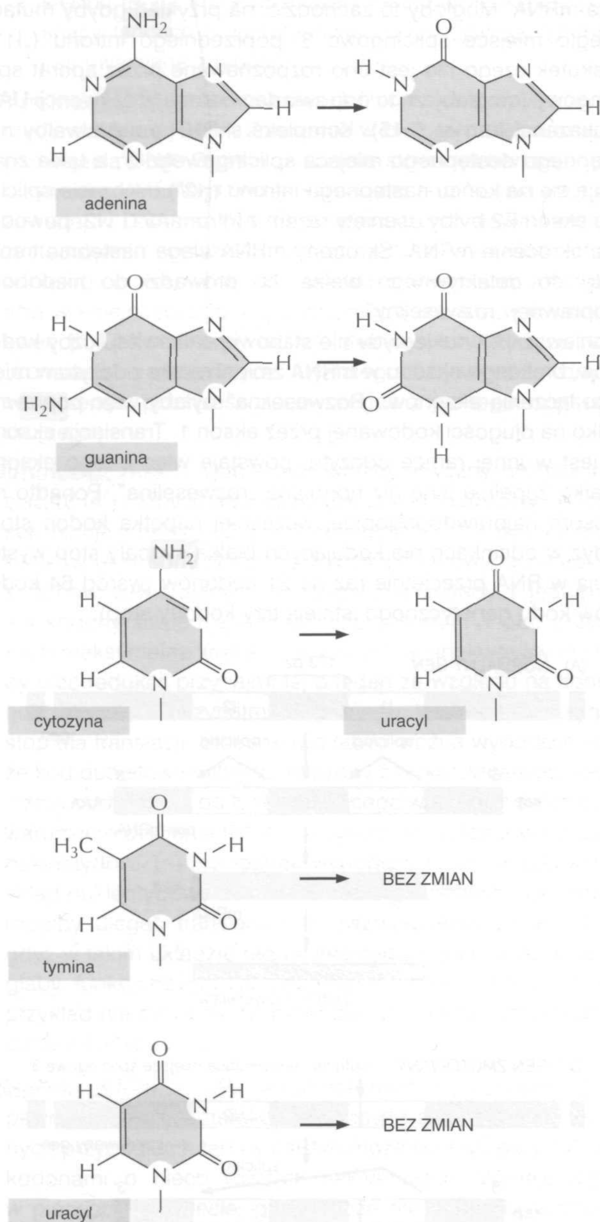
Odpowiedź 6-18. Patrz rys. O6-18.

Odpowiedź 6-19. Obydwa łańcuchy bakteryjnego chromosomu razem zawierają $6 \cdot 10^6$ nukleotydów. Podczas polimeryzacji na każdy nukleotyd wprowadzony do DNA, zostają zerwane dwa wiązania fosfobezwodnikowe: trifosforan nukleozydu ulega hydrolizie, dając monofosforan nukleozydu związany z łańcuchem i pirofosforan (PP_i), który z kolei ulega hydrolizie do nieorganicznego fosforanu (P_i). *Podczas każdej rundy replikacji bakteryjnego DNA zużywanych* jest $1{,}2 \cdot 10^7$ wiązań „wysokoenergetycznych". Do tego trzeba $4 \cdot 10^5$ cząsteczek glukozy ($1{,}2 \cdot 10^7/30$) ważących $1{,}2 \cdot 10^{-16}$ g [$= (4 \cdot 10^5$ cząsteczek $\cdot$ 180 g/mol) : ($6 \cdot 10^{23}$ cząsteczek/mol)], co stanowi 0,01% całkowitej masy komórki.

Odpowiedź 6-20. Twierdzenie to jest prawdziwe. Jeśli DNA komórek somatycznych nie jest dostatecznie stabilny (gromadzi zbyt szybko mutacje), to organizm umiera (na przykład z powodu raka), a ponieważ często może się to zdarzyć, zanim osiągnie zdolność do rozmnażania, gatunek także jest skazany na wymarcie. Jeśli DNA w komórkach rozrodczych nie jest stabilny, wiele zgromadzonych mutacji będzie przekazywanych na następne pokolenia i w rezultacie gatunek się nie utrzyma.

Odpowiedź 6-21. Jak pokazano na rys. O6-21, tymina i uracyl nie zawierają grup aminowych i dlatego nie ulegają deaminacji. Deaminacja adeniny lub guaniny prowadzi do pochodnych puryny, które nie występują w naturalnych kwasach nukleinowych. Deaminacja cytozyny natomiast prowadzi do uracylu. Gdyby uracyl był zasadą naturalnie występującą w DNA, enzymy naprawcze nie mogłyby rozróżnić, czy jakiś uracyl jest odpowiednią zasadą w konkretnej pozycji, czy też jest błędem powstałym w wyniku spontanicznej deaminacji C. Dylemat ten jednak nie istnieje, gdyż do budowy DNA jest wykorzystywana tymina. Jeśli zatem w DNA znajdzie się uracyl, to jest on automatycznie

rozpoznawany jako błędna zasada, wycinany i zastępowany cytozyną.



Rys. O6-21

Rozdział 7

Odpowiedź 7-1. Najlepszej odpowiedzi udzielił sam Francis Crick (w latach pięćdziesiątych był autorem tego określenia), wspominając: Pomysł ten określiłem jako „centralny dogmat" z dwóch powodów. Oczywiste słowo *hipoteza* wykorzystałem już w „hipotezie sekwencyjnej" zakładającej, że informacja genetyczna jest zakodowana w sekwencji zasad w DNA, a dodatkowo chciałem sugerować, że to nowe założenie było bardziej zasadnicze i dalekosiężne... Jak się jednak okazało, użycie słowa „dogmat" przyniosło więcej kłopotów niż pożytków. Wiele lat później Jacques Monod zwrócił mi uwagę, że nie rozumiałem poprawnie określenia „dogmat", które oznacza coś, co jest przedmiotem wiary i nie może być poddane w wątpliwość. Przekazałem mu niezbyt jednoznaczne słowa wdzięczności, ale ponieważ myślałem, że wszystkie wierzenia religijne są pozbawione racjonalnych podstaw, użyłem tego słowa w takim znaczeniu, w jakim je rozumiałem, a nie w takim, w jakim pojmował je świat, i po prostu użyłem go na określenie wielkiej hipotezy, która choć realna, miała w tamtym czasie niewiele bezpośrednich podstaw eksperymentalnych". (Francis Crick, *What Mad Pursuit*, s. 109).

Odpowiedź 7-2. Właściwie polimerazy RNA nie przesuwają się w ogóle, ponieważ podczas przygotowania preparatu do oględzin zostały utrwalone i napylone metalem, tak by stały się widoczne pod mikroskopem elektronowym. Przed utrwaleniem przesuwały się jednak od strony lewej ku prawej, na co wskazuje stopniowe wydłużanie się transkryptów.
Transkrypty RNA wydają się krótsze, ponieważ ulegają fałdowaniu (tzn. przybierają trójwymiarową strukturę) w miarę postępującej transkrypcji (patrz np. rys. 7-5), podczas gdy DNA występuje w formie rozciągniętej dwuniciowej helisy.

Odpowiedź 7-3. Na pierwszy rzut oka mogłoby się wydawać, że polimeraza wykorzystywana do transkrypcji może dobrze zastąpić prymazę. Po dalszym zastanowieniu się pojawiają się jednak problemy: 1) Polimerazy syntetyzujące startery muszą je inicjować co kilkaset zasad, a więc znacznie częściej, niż na DNA są rozmieszczone sekwencje promotorowe. Inicjacja powinna by w takim przypadku zachodzić w sposób niezależny od promotorów albo sekwencje promotorowe musiałyby w DNA występować znacznie częściej. W obu przypadkach byłoby to niekorzystne dla kontroli transkrypcji. 2) Startery do replikacji są znacznie krótsze niż mRNA. Polimeraza RNA musiałaby dlatego dokonywać terminacji znacznie częściej niż podczas transkrypcji. Ponadto terminacja powinna by następować w sposób spontaniczny, to znaczy bez sygnałów terminacji na DNA, lub DNA musiałby zawierać znacznie więcej takich sygnałów. Obydwa takie rozwiązania byłyby niekorzystne ze względu na kontrolę transkrypcji.
Jeśli nawet problem ten można by rozwiązać poprzez przyłączenie jakiegoś białka kontrolnego do polimerazy RNA czynnej podczas replikacji, to ewolucja dokonała wyboru odrębnych enzymów o wyspecjalizowanych właściwościach. Niektóre małe wirusy typu DNA wykorzystują jednak polimerazę RNA gospodarza do tworzenia starterów niezbędnych do replikacji ich genomu.

Odpowiedź 7-4. Twój szkic powinien ilustrować następujące etapy: 1) Wiązania snRNP do pierwotnego transkryptu, 2) utworzenie lassa i zerwanie miejsca splicingowego 5', 3) zerwanie miejsca splicingowego 3', połączenie dwóch sekwencji eksonowych i uwolnienie mRNA. Dla przebiegu reakcji ważne jest, żeby kompleks snRNP utrzymywał ekson 5' po pierwszej reakcji transestryfikacji, tak by mógł on zostać połączony w natępnym etapie z eksonem 3'. Gdyby reakcje te były katalizowane przez odrębne enzymy, to mogłyby wymieszać się i połączyć eksony różnych pierwotnych transkryptów.

Odpowiedź 7-5

1. UUUUUUUU... koduje Phe-Phe-Phe..., to znaczy polifenyloalaninę.

2. AUAUAUAU... koduje Ile-Tyr-Ile-Tyr, to znaczy polimer o przemiennie występujących resztach izoleucyny i fenyloalaniny. Ponieważ punkt startu translacji na rybosomie jest przypadkowy, produkt stanowi mieszaninę polipeptydów zaczynających się od Ile oraz od Tyr.
3. AUCAUCAUC... koduje mieszaninę trzech różnych polimerów. Ponieważ punkt startu translacji jest przypadkowy, rybosom rozpoczyna translację w każdej z trzech możliwych ramek odczytu: AUC-AUC-AUC... kodującej Ile-Ile-Ile..., UCA-UCA-UCA..., kodującej Ser-Ser-Ser... oraz CAU-CAU-CAU... kodującej His-His-His...

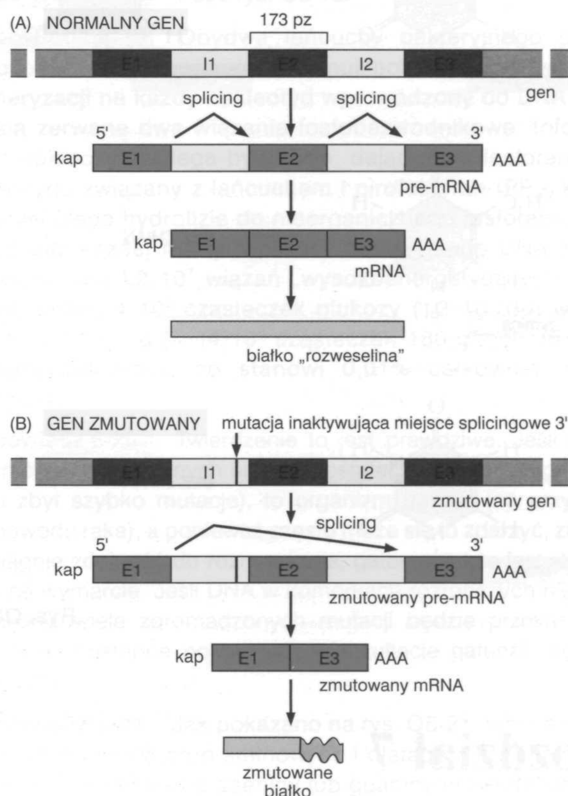
Odpowiedź 7-6. Polarność łańcucha RNA jest odwrotna niż polarność matrycy DNA, tak więc łańcuch RNA będzie miał sekwencję: 5'-GAAAAAAGCCGUUAA-3'. UAA jest kodonem stop. Dlatego C-końcowy aminokwas jest kodowany przez kodon CGU (koduje argininę). Aminokwasem N-końcowym jest kwas glutaminowy kodowany przez GAA. Zauważ, że zgodnie z przyjętą konwencją należy pisać sekwencję tego łańcucha DNA, który nie stanowi matrycy do syntezy RNA — jest to tzw. nić kodująca DNA. Jej sekwencja jest taka sama jak sekwencja RNA, z tym, że zamiast T w RNA występuje U.

Odpowiedź 7-7. Twierdzenie to jest prawdziwe. Przypuszcza się, że RNA był pierwszym enzymem zdolnym do replikacji autokatalitycznej, ale we współczesnych komórkach już nie pełni tej funkcji. Można jednak dyskutować, czy taka zmiana oznacza obniżenie rangi RNA. Rola RNA polega nie tylko na pełnieniu funkcji posłańca: służy jako starter do replikacji (rozdz. 6) i katalizuje niektóre podstawowe procesy zachodzące w komórkach.

Odpowiedź 7-8

A. Nieprawdziwe. Wszystkie rybosomy są jednakowe i mogą syntetyzować białka zgodnie z programem zawartym w mRNA. Po translacji jednego mRNA rybosomy ulegają oddysocjowaniu od niego i mogą podjąć translację następnego mRNA.
B. Nieprawdziwe. mRNA ulegają translacji jako liniowe polimery. Nie ma wymogu, by przybierały jakąś szczególną strukturę trójwymiarową. Jeśli w rzeczywistości powstają takie struktury, to hamują one translację, gdyż rybosom musiałby rozpleść mRNA, by odczytać zawartą w nim informację.
C. Nieprawdziwe. Podjednostki rybosomowe wymieniają swych partnerów po każdej rundzie translacji. Po uwolnieniu z mRNA rybosom ulega dysocjacji na dwie podjednostki wchodzące w ogólną pulę wolnych podjednostek, z których tworzą się nowe rybosomy po zainicjowaniu translacji nowego mRNA.
D. Nieprawdziwe. Rybosomy są organellami cytoplazmatycznymi, ale nie są otoczone błoną.
E. Nieprawdziwe. Kierunek transkrypcji wyznacza promotor, który wyznacza też nić DNA, mającą stanowić matrycę. Transkrypcja dokonywana w przeciwnym kierunku prowadziłaby do całkiem innej (i prawdopodobnie bezsensownej) sekwencji RNA.
F. Nieprawdziwe. RNA zawierają uracyl, a nie tyminę.
G. Nieprawdziwe. Poziom białka zależy od szybkości jego syntezy i rozkładu, ale nie od aktywności katalitycznej.

Odpowiedź 7-9. Delecja w mRNA kodującym białko „rozweselinę" dotyczy wewnętrznego rejonu, prawdopodobnie wynika więc z defektu podczas splicingu. Najprościej można to wytłumaczyć przyjmując, że gen „rozweseliny" zawiera ekson (oznaczony „E2" na rys. O7-9) o długości 173 nukleotydów, który ulega wycięciu podczas dojrzewania zmutowanego pre-mRNA. Mogłoby to zachodzić, na przykład gdyby mutacji uległo miejsce splicingowe 3' poprzedniego intronu („I1"), wskutek czego nie jest ono rozpoznawane przez aparat splicingowy (mogłaby za to odpowiadać zmiana w sekwencji UAG pokazanej na rys. 7-15). Kompleks snRNP poszukiwałby następnego dostępnego miejsca splicingowego 3', a takie znajduje się na końcu następnego intronu („I2") i w czasie splicingu ekson E2 byłby usunięty razem z intronami I1 i I2, powodując skrócenie mRNA. Skrócony mRNA ulega następnie translacji do defektywnego białka, co prowadzi do niedoboru poprawnej „rozweseliny".
Ponieważ 173 nukleotydy nie stanowią całkowitej liczby kodonów, brak tego eksonu w mRNA zmieni ramkę odczytu w miejscu łączenia eksonów. „Rozweselina" byłaby więc poprawna tylko na długości kodowanej przez ekson 1. Translacja eksonu 3 jest w innej ramce odczytu, powstaje więc z tego eksonu białko zupełnie inne niż normalna „rozweselina". Ponadto rybosom najprawdopodobniej wcześniej napotka kodon stop, gdyż w odcinkach nie kodujących białka sygnały stop występują w RNA przeciętnie raz na 21 kodonów (wśród 64 kodonów kodu genetycznego istnieją trzy kodony stop).



Rys. O7-9

Odpowiedź 7-10. Sekwencja 1 i sekwencja 4 kodują ten sam peptyd Arg-Gly-Asp. Ponieważ kod genetyczny jest zdegenerowany, różne sekwencje nukleotydowe mogą kodować jednakowe sekwencje aminokwasowe.

Odpowiedź 7-11

A. Nieprawdziwe. Wiązania nie są kowalencyjne i ich powstanie nie wymaga nakładu energii.

B. Prawdziwe. Aminoacylo-tRNA wchodzi do rybosomu w miejscu A.

C. Prawdziwe. Rybosom przesuwa się wzdłuż mRNA i cząsteczki tRNA, które przekazały resztę aminokwasu na rosnący łańcuch polipeptydowy, oddysocjowują od mRNA i są uwalniane z rybosomu.

Odpowiedź 7-12. Słownikowa definicja słowa *replikacja*: tworzenie dokładnej kopii. Znaczenie w biologii molekularnej: akt podwajania DNA. Ogólne znaczenie słowa *transkrypcja*: przepisywanie. W biologii molekularnej: akt kopiowania informacji zawartej w DNA na RNA. Ogólne znaczenie słowa *translacja*: zastępowanie wyrazów jednego języka wyrazami innego; w biologii molekularnej: akt liniowej polimeryzacji aminokwasów w kolejności zgodnej z informacją zawartą w liniowej sekwencji nukleotydów w mRNA. (Należy zauważyć, że termin „translacja" w matematyce i krystalografii bywa stosowany także w sensie przemieszczenia czegoś z jednego miejsca do drugiego).

Odpowiedź 7-13. Dubletowy kod genetyczny mógłby określać 16 (4^2) różnych aminokwasów, a kod trypletowy, w którym sekwencja nukleotydów jest niesistotna, 20 różnych aminokwasów (4 kodony złożone z trzech jednakowych zasad + 12 kodonów zawierających 2 identyczne zasady i jedną inną +4 kodony zawierające trzy różne zasady). W obu przypadkach maksymalna liczba kodowanych aminokwasów musiałaby ulec redukcji przynajmniej o jeden ze względu na konieczność działania przynajmniej jednego kodonu jako sygnału stop dla translacji. Stosunkowo łatwo można wyobrazić sobie, że kod dubletowy byłby tłumaczony z wykorzystaniem mechanizmu podobnego do funkcjonującego w naszym świecie, pod warunkiem działania tRNA z antykodonem złożonym z dwóch nukleotydów. Trudno jednak wyobrazić sobie, w jaki sposób skład nukleotydowy odcinka złożonego z trzech nukleotydów mógłby ulegać translacji bez uwzględnienia ich kolejności, gdyż w takim układzie reguła tworzenia się par zasad nie mogłaby funkcjonować. W „ziemskim" kodzie kodon CUG na przykład nie może tworzyć par zasad z takim samym antykodonem jak kodon GUC.

Odpowiedź 7-14. We współczesnych komórkach istnieje pewna tolerancja interakcji kodonów z antykodonami: w licznych przypadkach ten sam tRNA może tworzyć pary z kilkoma kodonami o nieco różnych sekwencjach. Wydaje się, że w pierwotnym świecie, gdy jeszcze nie było rybosomów tak wysoko rozwiniętych jak obecnie, które ułatwiają proces tworzenia się par zasad, istniała odwrotna sytuacja, to znaczy kilka różnych tRNA, z antykodonami niewiele się różniącymi, wiązało się z tym samym kodonem. Mogłoby to zniweczyć translację informacji genetycznej, chyba że aminokwasy, przenoszone przez wszystkie tRNA zdolne do wiązania się z tym samym kodonem, byłyby podobne pod względem chemicznym. Dobór naturalny mógł więc spowodować wiązanie chemicznie podobnych aminokwasów przez cząsteczki tRNA o podobnych antykodonach.

Możliwe, że w pierwotnym świecie, zanim wyewoluowały współczesne syntetazy aminoacylo-tRNA, istniała też pewna tolerancja w dobieraniu odpowiedniego aminokwasu do tRNA. Ten sam tRNA mógł być podatny na wiązanie kilku różnych aminokwasów o podobnym charakterze chemicznym. Można sobie wyobrazić ewolucję kodu genetycznego poprzez udoskonalanie procesu dopasowywania aminokwasów do tRNA, który początkowo zapewniał tylko luźne relacje między grupą podobnych kodonów a grupą podobnych aminokwasów.

Odpowiedź 7-15. Sekwencja 5'-UGG-3' stanowi kodon tryptofanowy. Antykodon normalnego tryptofanowego tRNA ma zatem sekwencję 5'-CCA-3'. Jeśli w takim tRNA wystąpi mutacja zmieniająca jego antykodon na UCA, to będzie on rozpoznawał kodon UGA. Zamiast stanowić sygnał „stop" kodon ten będzie teraz wprowadzał do białka tryptofan. Jednak wiele innych sekwencji kodujących białka zawiera kodony UGA jako naturalne miejsca „stop" i takie sygnały także ulegałyby wpływowi zmutowanego tRNA. Wszystkie te białka zawierałyby dlatego na końcu karboksylowym dodatkowe sekwencje aminokwasów. Długość tych sekwencji zależałaby od ilości kodonów, jakie uległyby translacji zanim rybosom dotarłby do kodonu stop innego niż UGA, ale leżącego w tej samej ramce odczytu, w jakiej zachodzi translacja.

Odpowiedź 7-16. Eksperyment ten w piękny sposób wykazuje, że rybosom nie sprawdza aminokwasu dołączonego do tRNA. Aminokwas raz połączony z tRNA zostaje przez rybosom „w ciemno" wprowadzony do białka w miejscu wyznaczonym przez oddziaływanie kodonu z antykodonem tRNA. Możemy wyciągnąć stąd wniosek, że to syntetazy aminoacylo-tRNA odczytują istotną część kodu genetycznego przez poprawne kojarzenie aminokwasów z tRNA.

Odpowiedź 7-17. Jednym ze skutecznych sposobów wymuszania zajścia reakcji „do końca" jest usuwanie produktów, dzięki czemu nie może ona przebiegać w kierunku odwrotnym. ATP zawiera dwa wiązania „wysokoenergetyczne", łączące trzy reszty fosforanowe. W przedstawionej reakcji zostaje uwolniony PP_i, składający się z dwóch reszt fosforanowych połączonych jednym wiązaniem „wysokoenergetycznym". Dlatego PP_i może ulec hydrolizie z wydzieleniem znacznej ilości energii swobodnej i w ten sposób zostaje skutecznie usunięty. W komórkach zachodzi to bardzo szybko i reakcje, w których PP_i powstaje i następnie szybko ulega hydrolizie, są praktycznie nieodwracalne (patrz rozdz. 3).

Odpowiedź 7-18

A. Cząsteczka tityny składa się z 25000 aminokwasów. Synteza jednej jej cząsteczki w komórkach mięśniowych trwa 3,5 godziny.

B. Ze względu na dużą wielkość tityny prawdopodobieństwo jej bezbłędnej syntezy wynosi 0,08 $[=(1-10^{-4})^{25000}]$, to znaczy, że tylko 8 cząsteczek na 100 nie zawiera błędu. Natomiast poprawnie jest syntetyzowane ponad 97% białek przeciętnej wielkości.

C. Czynnikiem ograniczającym wielkość białka jest częstość popełnianych błędów. Gdyby białko rybosomowe było syntetyzowane w postaci jednej wielkiej cząsteczki, to znaczna część (87%) cząsteczek zawierałaby błąd, podobnie jak w przypadku tityny. Korzystniejsza dla komórki jest dlatego synteza poszczególnych małych białek, gdyż w ten sposób tylko niewielka część każdego z białek zawiera błąd, a ponadto takie pojedyncze błędne białka mogą być z łatwością wyeliminowane, co zapewnia poprawną strukturę całego rybosomu.

D. Aby obliczyć czas potrzebny do zsyntetyzowania mRNA kodującego titynę, należałoby znać wielkość jej genu, który prawdopodobnie zawiera wiele intronów. Transkrypcja wyłącznie eksonów wymaga około 42 minut. Ponieważ

introny mogą być duże, czas potrzebny do transkrypcji całego genu prawdopodobnie jest znacznie dłuższy.

Odpowiedź 7-19. Najbardziej niebezpieczne są mutacje opisane w punktach b) i d). W obu tych przypadkach zmianie uległaby ramka odczytu, a ponieważ przesunięcie ramki odczytu miałoby miejsce w początkowym i środkowym rejonie sekwencji kodującej, znaczna część białka zawierałaby nonsensowne lub skrócone sekwencje aminokwasów. Przesunięcie ramki odczytu w końcowym rejonie sekwencji kodującej (scenariusz punktu a) spowodowałoby syntezę białka w większości poprawnego, które mogłoby spełniać swoje funkcje. Delecja trzech kolejnych nukleotydów (scenariusz c) prowadzi do delecji jednego aminokwasu, ale nie zmienia ramki odczytu. Aminokwas ulegający delecji może być istotny dla poprawnego fałdowania się białka i jego aktywności, albo może nie wywierać istotnego wpływu. W wielu przypadkach mutacje tego typu mają charakter „milczący", to znaczy nie mają wpływu na cały organizm lub ich wpływ jest tylko niewielki. Substytucja jednego nukleotydu przez inny jak w e), często jest zupełnie nieszkodliwa i niekiedy nawet nie powoduje zmiany sekwencji aminokwasowej białka lub może wywołać zamianę jednego aminokwasu na inny. W najgorszym przypadku substytucja taka może spowodować pojawienie się nowego kodonu stop, co prowadziłoby do syntezy białka o krótszym łańcuchu.

Rozdział 8

Odpowiedź 8-1. Podziałka skali na rys. 8-3 wynosi 50 milionów par nukleotydów. Używając jej do oszacowania ilości DNA upakowanego w chromosom 1 otrzymujemy około 256 milionów par nukleotydów. To daje cząsteczkę DNA o całkowitej długości 8,7 cm ($=256 \cdot 10^6 \cdot 0{,}34$ nm; 1 nm = 10^{-9} m), a stopień kondensacji: 8,7 cm/10 μm = 8700 razy.

Odpowiedź 8-2

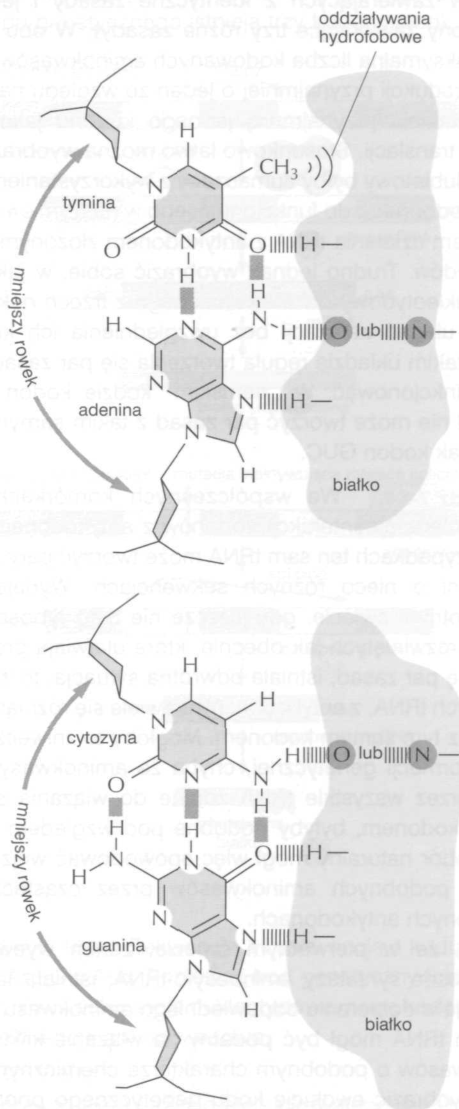
A. Jeśli jedno miejsce początku replikacji znajdowałaby się w środku chromosomu, replikacja chromosomu trwałaby więcej niż osiem dni [$= 75 \cdot 10^6$ nukleotydów/ (100 nukleotydów/s)]. Szybkość replikacji w dużym stopniu ograniczałaby tempo podziału komórkowego. (Jeśli start replikacji znajdowałaby się poza środkiem chromosomu, czas potrzebny do replikacji byłby znacznie dłuższy).

B. Koniec chromosomu, który nie byłby „zakryty" telomerem, traciłby nukleotydy podczas każdej rundy replikacji DNA i stopniowo skracałby się. Mogłoby dojść do tego, że niezbędne geny zostałyby utracone, co mogłoby prowadzić do śmierci komórki.

C. Bez centromeru, który służy jako miejsce przywiązania wrzeciona mitotycznego, dwa nowe chromosomy, które powstały w wyniku replikacji, nie mogłyby być prawidłowo rozdzielone do potomnych komórek. W ten sposób wiele komórek potomnych umierałoby, ponieważ nie miałyby pełnego zestawu chromosomów.

Odpowiedź 8-3. Mężczyzna ma tylko jedną kopię chromosomu X; nie ma zapasowej kopii uszkodzonego genu niesionego na tym chromosomie. Kobiety, przeciwnie, mają dwie kopie chromosomu X, po jednej od każdego z rodziców. Tak więc uszkodzona kopia genu na chromosomie X może, ogólnie rzecz biorąc, być kompensowana przez normalną kopię na drugim chromosomie. Z takim przypadkiem mamy do czynienia rozpatrując daltonizm. Podczas rozwoju kobiety transkrypcja jednego z chromosomów X zostaje wyłączona, ponieważ zostaje on zwinięty w heterochromatynę (rys. 8-12). Następuje to w sposób losowy i dotyczy raz jednego, a raz drugiego chromosomu X i dlatego niektóre komórki kobiety będą prowadziły ekspresję uszkodzonej kopii zmutowanego genu, podczas gdy w pozostałych będzie ulegać transkrypcji normalny gen. W wyniku tego w siatkówce przeciętnie co drugi czopek ma funkcjonalne fotoreceptory barw, a kobieta mająca zmutowany gen na jednym z chromosomów X widzi kolorowe obrazy ze zmniejszoną rozdzielczością. Kobieta, która jest daltonistką, musi mieć dwie uszkodzone kopie genu, które otrzymała od obojga rodziców. Jej ojciec musiał więc mieć mutację na swoim chromosomie X; był on daltonistą, ponieważ była to jego jedyna kopia tego genu. Jej matka mogła nieść defektywny gen na jednym lub na obu chromosomach X. Dlatego jej matka mogła być daltonistką (uszkodzone geny ma w obu chromosomach X) lub rozróżniać kolory z ograniczoną ostrością, jak opisano powyżej. W populacji ludzkiej odkryto kilka różnych typów dziedzicznego daltonizmu; to pytanie odnosiło się tylko do jednego typu.

Odpowiedź 8-4. Wiązania mogą się tworzyć między białkiem a atomami lub grupami na krawędziach par zasad, które są



Rys. O8-4

wyeksponowane w większym rowku DNA. Oddziaływania mogą zachodzić tak, jak to przedstawiono na rys. O8-4. Za specyficzne oddziaływania białek z określonymi sekwencjami DNA są odpowiedzialne wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe. W oddziaływaniach hydrofobowych mogą uczestniczyć grupy metylowe pierścienia pirymidynowego tyminy (T). Zauważ, że rozmieszczenie donorów i akceptorów wodoru w parze T·A jest inne niż w parze C·G. Podobnie rozmieszczenie donorów i akceptorów wodoru w parach A·T i G·C będzie się różniło od siebie i od par przedstawionych na rysunku. Oprócz kontaktów przedstawionych na rysunku, oddziaływania DNA–białko są zwykle stabilizowane przez oddziaływania jonowe między dodatnio naładowanymi aminokwasowymi łańcuchami bocznymi białka a ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi w szkielecie DNA.

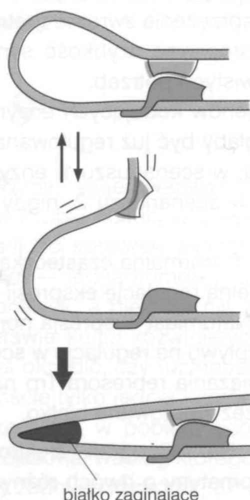
Odpowiedź 8-5

A. Światło UV powoduje przełączenie fazy profaga w fazę lityczną: kiedy białko cI zostaje uszkodzone, produkowane jest cro, które wyłącza produkcję cI. Wirus rozpoczyna syntezę białek kapsydu i tworzą się nowe cząstki wirusowe.

B. Kiedy światło UV zostaje wyłączone, wirus pozostaje w fazie litycznej. Tak więc cI i cro tworzą przełącznik regulacji genów, który „zapamiętuje" poprzedni stan otoczenia.

C. Tego typu przełączanie nadaje sens cyklowi życiowemu wirusa: światło UV może uszkadzać bakteryjny DNA (patrz rys. 6-28), przez co bakteria staje się zawodnym gospodarzem dla wirusa. Wirus w fazie profaga zatem włącza fazę lityczną i opuszcza naświetloną komórkę w poszukiwaniu nowego gospodarza do zainfekowania.

Odpowiedź 8-6. Białka zaginające mogą pomagać w zbliżaniu się odległych regionów DNA, które normalnie mogłyby kontaktować się ze sobą w sposób niewystarczający (rys. O8-6). Istnieje wiele przykładów na to, że te białka, odkryte zarówno u prokariotów jak i eukariotów, biorą udział w regulacji transkrypcji.



Rys. O8-06

Odpowiedź 8-7

A. Prawdziwe (patrz też pytanie 8-2, s. 250).

B. Nieprawdziwe. Bakterie mają tylko jedną polimerazę RNA, która transkrybuje wszystkie geny; natomiast komórki eukariotyczne mają trzy różne polimerazy, z których każda jest przeznaczona do jednej z trzech klas genów.

C. Prawdziwe. Prokariotyczne mRNA często są transkryptami całego operonu. Rybosomy mogą inicjować translację w wewnętrznych miejscach startu AUG, występujących na tych „policistronowych" mRNA (patrz rys. 7-29).

D. Prawdziwe. Większy rowek dwuniciowego DNA jest wystarczająco szeroki, aby zapewnić dostęp do par zasad takiej powierzchni białka, jak jedna strona α helisy.

E. Prawdziwe. Sprawowanie kontroli na możliwie najwcześniejszym etapie szlaku jest korzystne. Oszczędza to energię metaboliczną, ponieważ nie są tworzone niepotrzebne produkty.

F. Nieprawdziwe. Atomy cynku w domenach palców cynkowych są konieczne do prawidłowego zwinięcia domeny białkowej; leżą wewnątrz tych domen i nie kontaktują się z DNA.

G. Nieprawdziwe. Polimeraza RNA łatwo transkrybuje poprzez nukleosomy.

H. Nieprawdziwe. Białka rdzenia nukleosomu mają około 11 nm średnicy. Model ich upakowania w filamenty o średnicy 30 nm przedstawiono na rys. 8-10.

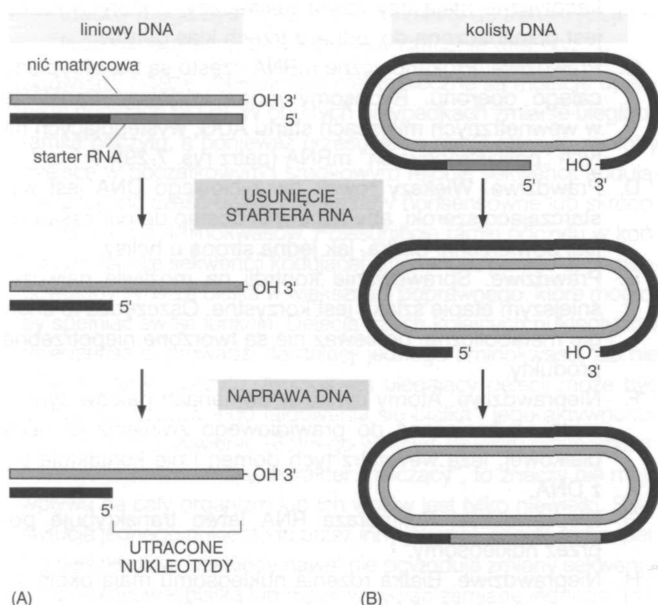
Odpowiedź 8-8. Definicje tych terminów można odnaleźć w słowniczku na końcu książki. DNA łączy się z wyspecjalizowanymi białkami tworząc *chromatynę*. Na pierwszym poziomie upakowania *histony* tworzą rdzeń *nukleosomu*. W nukleosomie DNA dwukrotnie oplata rdzeń. Pomiędzy podziałami jądra, to znaczy podczas interfazy, chromatyna *chromosomów interfazowych* ma stosunkowo rozwiniętą formę i jest rozproszona w jądrze, chociaż niektóre jej regiony pozostają gęsto upakowane i są nieaktywne transkrypcyjnie (*heterochromatyna*). Podczas podziału jądrowego, czyli podczas mitozy, zreplikowane chromosomy są skondensowane w *chromosomy mitotyczne*, które są transkrypcyjnie nieaktywne i przeznaczone do rozdzielenia pomiędzy dwie potomne komórki.

Odpowiedź 8-9

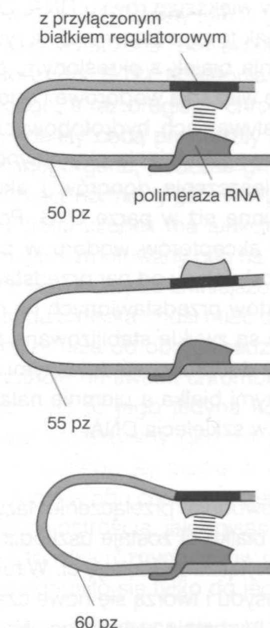
A. Bez telomerów i telomerazy końce chromosomów skracałyby się podczas każdej rundy replikacji, ponieważ nie byłoby grupy 3'-OH do rozpoczęcia syntezy tego odcinka DNA, który powinien uzupełnić miejsce powstałe po usunięciu startera ostatniego fragmentu DNA, syntetyzowanego na nici opóźnionej. Ponieważ chromosomy bakteryjne nie mają końców (są koliste), ten problem u nich nie występuje; zawsze będzie u nich dostępna grupa 3'-OH, działająca jako starter dla polimerazy DNA, która wymieni starter RNA na DNA (rys. O8-9). Telomery i telomeraza zabezpieczają *chromosomy przed skracaniem, ponieważ telomery* wydłużają końce 3' nici DNA powtórzeniami DNA, które są dodawane przez telomerazę bez udziału matrycy (patrz rys. 8-6). Podczas każdej rundy replikacji kilka z tych powtórzeń jest gubionych, ale telomeraza je uzupełnia.

B. Jak przedstawiono na rysunku O8-9, telomery i telomeraza są nadal niezbędne, nawet gdyby nić syntetyzowana w sposób nieciągły była inicjowana przez prymazę na samym końcu 3' chromosomowego DNA, ponieważ nadal byłby potrzebny starter RNA.

Odpowiedź 8-10. Kolonie są grupami komórek, które powstały z jednej założycielskiej komórki i rozrastały się na zewnątrz, ponieważ dzieliły się wiele, wiele razy. W dolnej kolonii na rysunku 8-13A gen *ade2* jest nieaktywny po przeniesieniu



Rys. O8-09



Rys. O8-11

w pobliże telomeru, ale najwidoczniej w kilku komórkach może dojść do spontanicznej aktywacji genu, przez co stają się one białe. Raz spontanicznie zaktywowany, gen *ade2* pozostaje aktywny w następnych pokoleniach tej komórki, dając w rezultacie grupę białych komórek (białe obszary) w kolonii. Ten rezultat dowodzi, że inaktywacja genu zlokalizowanego w pobliżu telomeru może zostać cofnięta, jak i tego, że zmiana ta jest przenoszona do następnych pokoleń (patrz rys. 8-33). Zmiana ekspresji *ade2* prawdopodobnie wynika ze spontanicznej dekondensacji struktury chromatyny wokół genu.

Odpowiedź 8-11. Według naszej wiedzy na temat sekwencji wzmacniających można oczekiwać, że ich działanie będzie stosunkowo niezależne od ich oddalenia od miejsca wiązania polimerazy RNA; ewentualnie ich wpływ powinien raczej słabnąć w miarę zwiększania odległości. Najbardziej zaskakującą cechą otrzymanych wyników (uzyskanych w rzeczywistym doświadczeniu) jest okresowość: sekwencja wzmacniająca jest najbardziej aktywna w określonych odległościach od miejsca wiązania polimerazy RNA (50, 60 lub 70 nukleotydów), ale niemal nieaktywna w odległościach pośrednich (55 lub 65 nukleotydów). Okresowość co 10 sugeruje, że cała tajemnica może tkwić w strukturze dwuniciowej helisy DNA, w której na jeden obrót przypada blisko 10 par zasad. Tak więc ustawienie sekwencji wzmacniającej DNA (kolor *czerwony*) po przeciwnej stronie w stosunku do promotora (rys. O8-11) może utrudniać jej oddziaływanie z białkami związanymi z promotorem. Gdy odległości są większe, duża ilość DNA pomiędzy sekwencją wzmacniającą a promotorem może skorygować ich wzajemne ustawienie i efekt się zmniejsza.

Odpowiedź 8-12. Dwie korzyści płynące z występowania białek wiążących DNA w postaci dimerów, to: 1) bardzo duża zdolność wiązania, wynikająca z podwojenia liczby potencjalnych miejsc kontaktowania się z DNA — w stosunku do monomeru oraz 2) możliwość tworzenia w komórce wielu różnych kombinacji różnych podjednostek w celu zwiększenia specyficzności rozpoznawania i wiązania sekwencji DNA. Trzy najczęściej występujące domeny białkowe zaangażowane w wiązanie DNA to suwak leucynowy, homeodomeny i palce cynkowe. Każda z nich stwarza szczególnie stabilną strukturę w łańcuchu polipeptydowym, która tak lokuje α helisę na powierzchni białka, aby mogła ona być wprowadzona do większego rowka helisy DNA i oddziaływać z krawędziami par zasad (patrz rys. 8-19).

Odpowiedź 8-13

A. Jeśli tryptofan występuje w komórce w wystarczających ilościach, to represor Trp blokuje syntezę enzymów, które mogłyby wytwarzać więcej tryptofanu. Podobnie gdy komórkom brak tryptofanu, pozbawiony tryptofanu represor nie może wiązać się z DNA i następuje indukcja enzymów syntetyzujących tryptofan. Taka prosta i elegancka forma inhibicji przez sprzężenie zwrotne (patrz rozdz. 5) pozwala komórkom dostosować szybkość syntezy tryptofanu do swoich rzeczywistych potrzeb.

B. Transkrypcja genów kodujących enzymy biosyntezy tryptofanu nie mogłaby być już regulowana przez nadmiar lub brak tryptofanu; w scenariuszu 1. enzymy będą stale syntetyzowane, a w scenariuszu 2. nigdy nie dojdzie do ich syntezy.

C. W scenariuszu 1. normalna cząsteczka represora tryptofanu przywróci pełną regulację ekspresji enzymów biosyntezy tryptofanu. Natomiast ekspresja normalnego białka nie będzie miała wpływu na regulację w scenariuszu 2., ponieważ miejsce wiązania represora Trp na DNA stale będzie zajmowane przez zmutowane białko.

Odpowiedź 8-14. Na mikrografii elektronowej można dostrzec regiony chromatyny o dwóch różnych gęstościach; silnie wybarwione regiony odpowiadają heterochromatynie, natomiast mniej skondensowana chromatyna wybarwia się jaśniej. Większość chromatyny w jądrze A występuje w formie skondensowanej, transkrypcyjnie nieaktywnej heterochromatyny, natomiast większość chromatyny w jądrze B jest w formie rozproszonej i potencjalnie zdolnej do transkrypcji. Jądro A pochodzi z retikulocytu, prekursora krwinki czerwonej, wytwarzającego głównie jedno białko — hemoglobinę. Jądro

B pochodzi z limfocytu, w którym zachodzi transkrypcja wielu różnych genów.

Odpowiedź 8-15. Jest to eksperyment, który pokazuje, że pojedyncza zróżnicowana komórka pobrana z wyspecjalizowanej tkanki może odtworzyć cały organizm. Dowodzi to, że komórka zawiera pełną informację konieczną do utworzenia całego organizmu, łącznie ze wszystkimi wyspecjalizowanymi typami komórek. Patrz rys. 8-16.

Odpowiedź 8-16. Posługując się czterema różnymi białkami regulatorowymi genów można utworzyć 16 różnych typów komórek (8 typów komórek przedstawionych na rys. 8-31 plus dodatkowe 8, powstające przez dodanie jeszcze jednego białka regulatorowego). Samo białko MyoD wystarczy do indukcji ekspresji genów mięśniowospecyficznych tylko w pewnych typach komórek, takich jak niektóre rodzaje fibroblastów. Działanie MyoD jest więc zgodne z modelem przedstawionym na rys. 8-31: jeśli komórki mięśniowe ulegają specjalizacji dzięki działaniu białek regulatorowych genów 1, 3 i MyoD, to dodanie MyoD będzie przekształcać w mięśnie tylko dwa typy komórek z rys. 8-31 (komórki F i H).

Odpowiedź 8-17. Wiele białek regulatorowych zawsze powstaje w komórce; to znaczy, że ich ekspresja jest konstytutywna, a aktywność białka jest regulowana przez sygnały pochodzące z wewnątrz lub zewnątrz komórki (np. przez dostępność składników pokarmowych — dla represora Trp lub obecność hormonów — dla receptora glukokortykoidów), dostosowując w ten sposób program transkrypcji do rzeczywistych potrzeb fizjologicznych komórki. Ponadto jedno białko regulatorowe zwykle reguluje ekspresję wielu różnych genów. Białka regulatorowe genów są często używane w różnych kombinacjach i mogą wzajemnie wpływać na swoją aktywność, tym samym jeszcze bardziej zwiększając możliwy repertuar regulacji ekspresji genów za pomocą ograniczonego zespołu białek. Komórka poświęca jednak dużą część swojego genomu na kontrolowanie transkrypcji: w przybliżeniu 10% wszystkich genów w komórkach eukariotycznych koduje białka regulatorowe genów.

Rozdział 9

Odpowiedź 9-1. Wynik sugerowanego „pójścia na skróty" byłby niekorzystny. Próbki kultury o objętości 1 μl zawierają statystycznie różne ilości komórek: niektóre próbki miałyby — zgodnie z życzeniem — jedną komórkę, ale inne zawierałyby dwie lub więcej komórek, a niektóre nie zawierałyby bakterii w ogóle. Na podstawie kultur rozwiniętych z tak pobranych próbek nie mógłbyś określić, czy rozmnożone komórki są potomstwem rzeczywiście tylko jednej komórki bakteryjnej. (Statystycznie liczba komórek w pobieranych próbkach spełnia warunki rozkładu Poissona, według którego 37% próbek o obj. 1 μl nie zawierałoby żadnych komórek, 37% próbek zawierałoby po jednej komórce, 18% zawierałoby dwie komórki, a 8% — trzy lub więcej.)

Odpowiedź 9-2

A. Kolonie tworzą te bakterie, w których doszło do ponownej mutacji, odwracającej efekty pierwszej mutacji w genie *lac Y*. Często nowa mutacja zmienia sekwencję zmutowanego genu z powrotem do sekwencji typu dzikiego.

B. Komórki *E. coli* pozbawione systemu naprawy źle dobranych par zasad akumulują mutacje z większą częstością dlatego, że nie korygują błędów powstających podczas replikacji DNA. Niewielki ułamek tych mutacji spowoduje naprawę zmutowanego wcześniej genu. Ponieważ częstość przypadkowych mutacji w szczepie *E. coli* pozbawionym systemu naprawy źle dobranych par zasad jest około 100 razy większa niż w szczepach z poprawnie działającym systemem, na płytkach agarowych pojawi się więcej kolonii zdolnych do wykorzystywania laktozy.

Odpowiedź 9-3. Bakteriofag lambda przede wszystkim będzie przejmował geny znajdujące się w pobliżu jego miejsca integracji. Jednak inne wirusy bakteryjne (takie jak P1), mogą do swego kapsydu upakować jakikolwiek gen bakteryjny.

Odpowiedź 9-4. Każdorazowo gdy transpozon ulegnie integracji z chromosomem, zmiana ta może być obojętna, korzystna lub szkodliwa dla organizmu. Ponieważ osobniki, w których dochodzi do akumulacji szkodliwych insercji, ulegają eliminacji przez dobór, mnożenie się transpozonów jest kontrolowane przez dobór naturalny. Gdyby powstał transpozon mnożący się w sposób niekontrolowany, to prawdopodobieństwo utrzymania się organizmu będącego gospodarzem takiego transpozonu byłoby nikłe. Z tego powodu większość transpozonów ewoluowała w taki sposób, by tylko rzadko ulegać transpozycji. Na przykład wiele transpozonów jedynie rzadko syntetyzuje bardzo małe ilości transpozazy potrzebnej do ich przemieszczania się.

Odpowiedź 9-5. Zanim będzie możliwa synteza jakiegokolwiek wirusowego białka, w przypadku wirusów RNA typu „minus", musi zostać zsyntetyzowana nić „plus" RNA, komplementarna do genomu wirusa. Ponieważ enzym przeprowadzający taką reakcje — replikaza RNA — jest kodowany przez wirusa, cząstka wirusowa musi zawierać wewnątrz kapsydu kilka cząsteczek tego białka. Podczas infekcji do komórki gospodarza musi być wprowadzony zarówno genom wirusowy, jak i replikaza RNA.

Odpowiedź 9-6. Wirus wywołujący AIDS (ludzki wirus niedoboru odporności, HIV) jest retrowirusem, a więc syntetyzuje DNA na matrycy RNA, wykorzystując w tym celu odwrotną transkryptazę. Prowadzi to do częstych mutacji genomu wirusa. Pacjenci cierpiący na AIDS często mają wiele różnych wariantów HIV, odmiennych od wariantu, który ich zainfekował. Stwarza to poważne problemy w terapii AIDS: leki blokujące enzymy istotne dla funkcji wirusa działają tylko przejściowo, ponieważ w wyniku mutacji szybko tworzą się nowe szczepy wirusa, odporne na stosowany lek.
Replikaza RNA (polimeraza RNA syntetyzująca RNA na matrycy RNA, patrz rys. 9-28) nie zawiera mechanizmu redagowania, to znaczy nie może korygować swego produktu. Wirusy typu RNA, których genom ulega bezpośredniej replikacji, także często ulegają mutacji. W wirusach tego typu przybiera to tendencje do wprowadzania zmian w białku kapsydu, co jest odczytywane przez system immunologiczny jako wtargnięcie „nowego" białka. Dzięki temu rozwój wirusa nie jest hamowany przez odpowiedź immunologiczną, jaka wykształciła się w stosunku do poprzedniej jego wersji. Ten sam powód stanowi też częściowe wyjaśnienie regularnego pojawiania się nowych szczepów wirusa grypy i kataru.

Odpowiedź 9-7. Kobieta wytwarza w ciągu swego życia przeciętnie mniej niż 1000 dojrzałych komórek jajowych (12 jaj rocznie przez około 40 lat); jest to mniej niż dziesiąta część procentu gamet, które mogłyby powstać podczas mejozy (nawet jeśli wykluczy się crossing-over). Typowy mężczyzna w ciągu swego życia wytwarza miliardy plemników, tak więc w zasadzie wszystkie możliwe kombinacje chromosomów są powtórzone wiele razy.

Odpowiedź 9-8

A. Prawdziwe.
B. Prawdziwe.
C. Nieprawdziwe. Mutacje następujące podczas mejozy mogą być przekazywane na dalsze pokolenia, chyba że prowadzą do rozwoju gamet niezdolnych do życia.
D. Prawdziwe. Komórki mogą pobierać cząsteczki DNA i jeśli geny zawarte w tym DNA mają promotory, a transkrypty są rozpoznawane przez rybosomy komórki pobierającej, to takie geny ulegają ekspresji. Wiele bakterii pobiera DNA bardzo skutecznie, ale komórki eukariotyczne muszą być do tego zmuszone w laboratorium.
E. Nieprawdziwe. Komórki mogą wytwarzać wiele kopii wirusa wykorzystując genom wirusowy zintegrowany z chromosomem.
F. Prawdziwe. Jednoniciowy RNA genomu retrowirusów nie może bezpośrednio ulegać translacji do białek, toteż aby wytworzyć kopię swego genomu w formie DNA, retrowirusy potrzebują gotowej odwrotnej transkryptazy, którą wprowadzają razem z genomowym RNA do infekowanej komórki. Kopia DNA ulega następnie integracji z genomem gospodarza oraz transkrypcji przez polimerazę RNA, co prowadzi do mRNA, który ulega translacji do białka. Komórki na ogół nie zawierają odwrotnej transkryptazy, która mogłaby wydajnie pracować na wirusowym genomie. Wirus wprowadza dlatego swój własny enzym do komórki.
G. Prawdziwe. Jeśli mogłyby rekombinować nie odpowiadające sobie regiony chromosomów, to zachodzące wówczas przegrupowania prawie zawsze byłyby szkodliwe dla organizmu. Jednak niektóre rzadkie zdarzenia niesymetrycznego crossing-over były korzystne dla organizmów, czego dowody znajdujemy we współczesnych genomach (patrz rys. 9-19, 9-20 i 9-21).
H. Nieprawdziwe. Kapsydy wirusów są zrobione z białek, lub w przypadku wirusów z osłonką — kapsyd ulokowany wewnątrz wirionu ma dodatkową osłonkę z dwuwarstwy lipidowej, zawierającą dodatkowe białka. Okrywa białkowa i osłonka stanowią ochronę dla wirusowego DNA lub RNA, zawartego wewnątrz kapsydu.

Odpowiedź 9-9. Organizmy diploidalne zawierają w większości swych komórek po dwie kopie każdego z genów. Jedna z nich stanowi „zapasową kopię" genów, które mogą ulec uszkodzeniu przez mutację. Sytuacja taka komplikuje badania genetyczne. Wiele mutacji u diploidów nie powoduje jakichkolwiek wykrywalnych objawów w procesach komórkowych, ponieważ równoczesna ekspresja genu niezmutowanego może kompensować efekty genu zmutowanego. Gdyby diploidalny organizm wytwarzał diploidalne gamety, to w każdym pokoleniu podwajałaby się liczba chromosomów. Sugerowano ponadto, że haploidalne gamety mogą eliminować wiele szkodliwych mutacji (co mogłoby nie zachodzić w przypadku komórek diploidalnych), ponieważ uszkodzone gamety są niezdolne do zapłodnienia. Liczba wytwarzanych gamet zwykle znacznie przekracza liczbę, którą można by uznać za wystarczającą. Gamety konkurują dlatego między sobą, a wygrywają te, które najlepiej zdały egzamin „dopasowania". Na przykład miliony plemników ssaków współzawodniczą w ostrym wyścigu, by osiągnąć pojedynczą komórkę jajową i wniknąć do niej.

Odpowiedź 9-10. Ewolucja w dużym stopniu zależy od współzawodnictwa między poszczególnymi osobnikami, z których każdy zawiera nieco odmienny wariant zestawu genów. Przypuśćmy, że dwie komórki w populacji ulegną mutacjom, przy czym każda z nich będzie korzystna, ale każda dotyczy innego genu. W gatunku ściśle bezpłciowym z każdej z tych mutacji rozwinie się populacja zmutowanych komórek. Komórki obu populacji będą ze sobą współzawodniczyć, aż jedna z nich zdominuje drugą. W takich warunkach rozpowszechni się tylko jedna ze wspomnianych korzystnych mutacji, druga natomiast zostanie stracona. Jeśli jednak jedna z wyjściowych zmutowanych komórek wytworzy mechanizm pozwalający na włączanie genów innych komórek, to taka komórka może pozyskać także drugą korzystną mutację. Doprowadziłoby to do utworzenia się komórki zawierającej obydwie korzystne mutacje. Taka komórka byłaby najlepsza ze wszystkich, a jej sukces prowadziłby także do utrwalenia się takiej linii, która umożliwia wprowadzanie genów pochodzących z innych komórek. Takie zaczątkowe zdolności płciowe byłyby zatem faworyzowane przez dobór naturalny.

Odpowiedź 9-11. Ze swoimi zdolnościami do przenoszenia sekwencji kwasów nukleinowych z komórki do komórki, wirusy prawie na pewno odegrały ważną rolę w ewolucji organizmów, które zakażają. Wiele wirusów przejmuje przypadkowe małe odcinki chromosomu gospodarza i przenosi je do innych komórek lub organizmów. Wirusy mogą dlatego przyspieszyć ewolucję, ułatwiając mieszanie się różnych pul genowych. Chociaż są szkodliwe dla indywidualnego organizmu, dla gatunku jako całości prawdopodobnie są korzystne.

Odpowiedź 9-12

A. Jakiś składnik ekstraktu ze spleśniałych orzeszków ziemnych powoduje zmianę w niektórych komórkach bakteryjnych, która umożliwia im wzrost na podłożu pozbawionym histydyny. Ponieważ zmiana ta jest dziedziczna (przypomnijmy sobie, że komórki wyizolowane z kolonii tworzących pierścień w pobliżu środka płytki, po przeniesieniu na nową płytkę rosną bez dodatku histydyny), musi nią być mutacja odwracająca efekt mutacji wyjściowej, powodującej uzależnienie wzrostu komórek od obecności histydyny w podłożu. Wynika z tego, że ekstrakt ze spleśniałych orzeszków ziemnych musi zawierać mutagen, to jest związek powodujący mutacje drogą uszkodzeń DNA. Tak więc nie jedz spleśniałych orzeszków!
B. Pierścień kolonii tworzy się dlatego, że mutagen zawarty w ekstrakcie dyfunduje, tworząc gradient stężenia, od największego w miejscu nałożenia kropli ekstraktu do najmniejszego na obrzeżach płytki. Komórki znajdujące się zbyt blisko środka płytki, trafiają na bardzo duże stężenie mutagenu, który powoduje tak poważne uszkodzenia ich DNA, że komórki umierają. W odpowiedniej odległości od nałożonej kropli, szybkość mutacji jest duża, ale nie tak duża, by zabić komórki. W jeszcze większej odległości od

środka płytki szybkość mutacji jest na tyle mała, że nie można wykryć ewentualnych mutantów.

C. Każda z trzydziestu trzech kolonii powstała z pojedynczej zmutowanej komórki. Mutagen może powodować mutacje na obszarze całego chromosomu bakteryjnego, ale tylko bardzo mało spośród nich spowoduje odwrócenie efektów wyjściowej mutacji. Dlatego tylko niewielka część posianych bakterii znajdujących się w rejonie pierścienia uległa zmutowaniu w odpowiedni sposób i rozwinęła się w kolonie.

Działa tu aflatoksyna, jeden z najsilniejszych znanych mutagenów. Wytwarza ją szczególna pleśń, rosnąca na orzeszkach. Aflatoksyna jest powodem raka żołądka u ludzi w krajach, w których pleśń ta występuje obficie, a orzeszki ziemne stanowią istotną część diety. Ponieważ większość raków człowieka wynika z mutacji gromadzących się w komórkach naszego ciała (patrz rys. 6-24), jest oczywiste, że zjadanie mutagenu zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia raka. Eksperyment tego typu, jak opisany w pytaniu, wykorzystuje się jako standardowy test stwierdzający, czy jakieś substancje są mutagenne i mogłyby wywoływać raka u człowieka. Na przykład w podobnym eksperymencie dym tytoniowy daje wyniki dodatnie, tj. zawiera substancje mutagenne.

Odpowiedź 9-13. Główna różnica polega na tym, że wirusy kodują białka kapsydu, a plazmidy nie. Plazmidy mogą istnieć tylko jako „nagi" DNA, natomiast genomy wirusów są otoczone przez białka i chronione przez białkowy kapsyd. Dzięki temu wirusy mogą przetrwać na zewnątrz komórki. Okrywa białkowa umożliwia też przyłączanie się wirusów do zewnętrznych części komórek będących ich gospodarzami i ułatwia wniknięcie genomu wirusa do infekowanej komórki.

Odpowiedź 9-14. W odpowiedzi należy wskazać na konieczność utrzymywania przez komórkę równowagi pomiędzy stabilnością i zmianami. Gdyby szybkość mutacji była zbyt duża, gatunek mógłby zaniknąć, ponieważ wszystkie osobniki do niego należące gromadziłyby zbyt wiele mutacji w genach umożliwiających przetrwanie. Dla ewolucyjnego powodzenia jakiegoś gatunku konieczne jest, by jego indywidualni członkowie mieli dobrą pamięć genetyczną, to jest replikowali DNA z dużą wiernością, ale także i to, by okazjonalnie wprowadzali zmiany. Jeśli zmiana taka prowadzi do ulepszenia, to zostanie utrwalona przez selekcję. Jeśli okaże się szkodliwa, to indywidualny organizm będący niefortunnym obiektem eksperymentu dokonywanego przez naturę — umrze, ale nie zginie cała populacja.

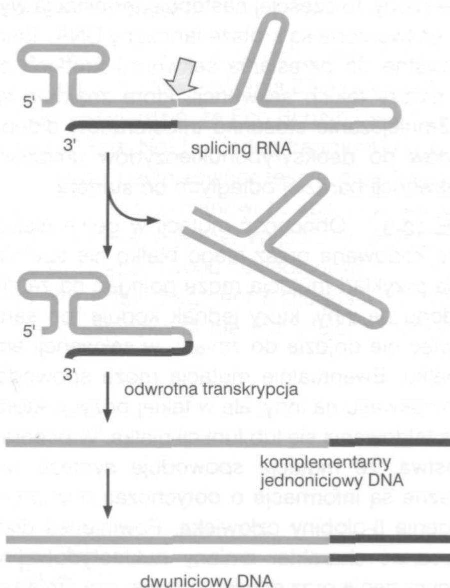
Odpowiedź 9-15. Informacyjne RNA mogłyby być z powrotem przekształcone w sekwencje DNA. Sekwencje DNA różniłyby się od sekwencji genów, ponieważ zawierałyby mutacje, gdyż odwrotna transkryptaza nie kopiuje tak dokładnie, jak czynią to polimerazy DNA. Ponadto sekwencje DNA nie zawierałyby intronów, gdyż te są usuwane w procesie splicingu zanim mRNA przejdzie z jądra do cytoplazmy (patrz rozdz. 7). Sekwencje DNA kopiowane z mRNA mogłyby ulegać rekombinacjom homologicznym, podobnie jak to przedstawiono na rys. 9-13A, i zastępować sekwencje chromosomowe. Proces taki ostatecznie wprowadziłby do genomu wiele mutacji, stwarzając ryzyko eliminacji gatunku.

Odpowiedź 9-16. Wirusy nie mogą istnieć jako organizmy wolno żyjące: nie mają metabolizmu, nie komunikują się z innymi wirusami i poza komórką nie mogą się namnażać. Tak więc nie mają żadnego z atrybutów normalnie związanych z życiem. Co więcej, można je nawet krystalizować. Wewnątrz komórek przekształcają one normalne komórkowe tory biosyntez zgodnie z potrzebami wynikającymi z zadania wytworzenia dużej liczby własnych kopii, ale wirus nie może rozwijać się nie eksploatując komórki gospodarza. Tak więc jedynym aspektem życia wykazywanym przez wirusy jest ich zdolność do sterowania własnym namnażaniem po wniknięciu do komórki.

Odpowiedź 9-17. Transpozony mogą stwarzać możliwości rekombinacji homologicznych, powodując dzięki temu przegrupowania genomu. Potrafią dokonać insercji w genie, możliwie zachowując miejsca splicingowe, i zmienić w ten sposób strukturę genu. Mogą także dokonać insercji w rejonie reglulatorowym jakiegoś genu, przy czym insercja pomiędzy sekwencją wzmacniającą (enhancerową) a miejscem startu transkrypcji mogłaby blokować funkcję sekwencji wzmacniającej i redukować tym samym poziom ekspresji genu. Ponadto same transpozony mogą zawierać sekwencje wzmacniające i zmieniać dzięki temu miejsce i czas ekspresji genu.

Odpowiedź 9-18. Pseudogen nie będzie zawierał intronów, ponieważ pochodzi od mRNA, który już wcześniej podlegał splicingowi. Ponieważ prawdopodobnie jest też pozbawiony promotora, jego transkrypcja jest bardzo wątpliwa. W genomach ssaków wykryto wiele takich nieaktywnych pseudogenów. Przypuszcza się, że są one nieszkodliwymi reliktami jakichś zdarzeń w historii gatunku, w których brała udział odwrotna transkryptaza. Pseudogeny często są niekompletne, gdyż odwrotna transkryptaza mogła skopiować niecały mRNA.

Odpowiedź 9-19. Sekwencje Alu nie zawierają środkowej części 7SL RNA, zaznaczonej kolorem *niebieskim* na rys. P9-19 (s. 312). Możemy dlatego przypuścić, że zaszło rozcięcie i ponowne połączenie (być może niedokładna reakcja splicingu) łańcucha, co prowadziło do skrócenia intermediatu RNA, jak pokazano to na rys. O9-19. Odwrotna transkrypcja tego RNA prowadziłaby do jednoniciowego DNA. On po usunięciu matrycy RNA mógł następnie służyć jako matryca do syntezy drugiej nici DNA, co ostatecznie prowadziło do dwuniciowej cząsteczki



Rys. O9-19

DNA (patrz rys. 9-23 i 9-30). Utworzony odcinek dwuniciowego DNA mógł następnie ulec integracji z chromosomowym DNA. Podczas transkrypcji i przekształcania w DNA transpozon mógł dokonać insercji dodatkowych kopii swoich sekwencji w dowolne miejsce chromosomu gospodarza. Wszystkie opisane tu reakcje są koncepcyjnie możliwe i wykorzystują mechanizmy działające we współczesnych komórkach.

Odpowiedź 9-20. Nie uwzględniając rekombinacji przedstawiciel tego gatunku może wytworzyć $2^4 = 16$ genetycznie różnych gamet. Jeśli doliczymy do tego wykluczone poprzednio rekombinacje (każdy chromosom ma 2^3 możliwych kombinacji), to całkowita liczba możliwych rodzajów gamet wyniesie $2^7 = 208$. Jeśli, tak jak w realnym życiu, miejsca chromosomowych crossing-over nie będą ograniczone (czyli crossover pomiędzy homologicznymi chromosomami mógłby mieć miejsce gdziekolwiek wzdłuż chromosomu), to liczba możliwych gamet byłaby znacznie większa.

Rozdział 10

Odpowiedź 10-1

A. Trawienie Eco RI prowadzi do 2 produktów:

5'- AAGAATTGCGG AATTCGAGCTTAAGGGCCGCGCCGAAGCTTTAAA-3'
3'- TTCTTAACGCCTTAA GCTCGAATTCCCGGCGCGGCTTCGAAATTT-5'

B. Po trawieniu Alu I otrzymuje się trzy produkty

5'-AAGAATTGCGGAATTCGAG CTTAAGGGCCGCGCCGAAG CTTTAAA-3'
3'-TTCTTAACGCCTTAAGCTC GAATTCCCGGCGCGGCTTC GAAATTT-5'

C. Odcinek DNA nie zawiera miejsca rozpoznawanego przez Not I.

D. Trawienie wszystkimi trzema enzymami prowadzi więc do:

5'-AAGAATTGCGG AATTCGAG CTTAAGGGCCGCGCCGAAG CTTTAAA-3'
3'-TTCTTAACGCCTTAA GCTC GAATTCCCGGCGCGGCTTC GAAATTT-5'

Odpowiedź 10-2. Jeśli stosunek trifosforanów dideoksyrybonukleozydów do trifosforanów deoksyrybonukleozydów zostaje zwiększony, to częściej następuje terminacja wydłużania DNA, a więc tworzone są krótsze łańcuchy DNA. Takie warunki są korzystne do określania sekwencji krótkich odcinków DNA, to znaczy takich sekwencji, które znajdują się blisko startera. Zmniejszanie stosunku trifosforanów dideoksyrybonukleozydów do deoksyrybonukleozydów umożliwia oznaczenie sekwencji bardziej odległych od startera.

Odpowiedź 10-3. Obecność mutacji w genie niekoniecznie znaczy, że kodowane przez niego białko nie spełnia swoich funkcji. Na przykład mutacja może polegać na zamianie jednego kodonu na inny, który jednak koduje ten sam aminokwas, a więc nie dojdzie do zmiany w sekwencji aminokwasów w białku. Ewentualnie mutacja może spowodować zamianę aminokwasu na inny, ale w takiej pozycji, która nie jest istotna dla fałdowania się lub funkcji białka. W ocenie prawdopodobieństwa, że mutacja spowoduje syntezę wadliwego białka, ważne są informacje o dotychczas poznanych mutacjach w genie β-globiny człowieka. Powinieneś dlatego dokładnie poznać charakter zmiany nukleotydowej w twoim zmutowanym genie oraz dowiedzieć się, czy zmiana ta może doprowadzić do dających się przewidzieć dysfunkcji kodowanego białka. Jeśli twoja partnerka ma dwie normalne kopie genu globinowego, to żadne z waszych dzieci nie będzie przejawiało objawów chorobowych wynikających z wadliwej hemoglobiny (np. talasemii). Jednak 50% waszych dzieci będzie nosicielami jednego genu zmutowanego.

Odpowiedź 10-4. Chociaż możliwe jest kilka wyjaśnień, najprostsze jest to, że sonda DNA hybrydyzowała głównie z odpowiadającym jej mRNA, który — jeśli gen ulega ekspresji — występuje w komórkach w znacznie większej liczbie kopii niż gen. Komórki silnie hybrydyzujące prawdopodobnie mają dużą zawartość tego mRNA.

Odpowiedź 10-5. Z 15 nukleotydów można by utworzyć około 10^9 różnych sekwencji ($4^{15} = 1\,073\,741\,824$). Dlatego można się spodziewać, że jakakolwiek sekwencja utworzona przez 15 nukleotydów statystycznie wystąpi w genomie człowieka trzy razy. Ponieważ sonda pokazana na rysunku jest mieszaniną 16 różnych oligonukleotydów o długości 15 nukleotydów, można przewidywać, że w genomie wystąpi ok. 48 ($= 3 \cdot 16$) miejsc komplementarnych, z których tylko jedno miejsce odpowiada sekwencji występującej w genie czynnika VIII. Aby upewnić się, że odcinek DNA wykryty sondą istotnie zawiera gen czynnika VIII, należałoby określić sekwencję aminokwasową dodatkowego odcinka białka i powtórzyć badania, stosując drugą sondę oligonukleotydową. Jeśli obydwie sondy hybrydyzowałyby z genomem blisko siebie, to byłoby to wyraźną wskazówką, że istotnie wyizolowano gen czynnika VIII.

Odpowiedź 10-6

A. Po jednej dodatkowej rundzie amplifikacji będą 2 *szare*, 4 *zielone*, 4 *czerwone* i 22 fragmenty na *żółtym* tle; po dodatkowej rundzie będą 2 *szare*, 5 *zielonych*, 5 *czerwonych* i 52 fragmenty na *żółtym* tle. Tak więc fragmenty pokazane na żółtym tle przyrastają wykładniczo i ostatecznie zdominują inne produkty reakcji. Długość tych fragmentów jest dokładnie wyznaczona odległością pomiędzy dwoma starterami użytymi do powielania.

B. Masa jednej cząsteczki DNA o długości 500 nukleotydów wynosi $5{,}5 \cdot 10^{-19}$ g [$= 2 \cdot 500 \cdot 330$ (g/mol) $/6 \cdot 10^{23}$ (cząsteczek/mol)]. Jeśli pominąć złożoność kilku pierwszych etapów powielania (w czasie których powstają dłuższe produkty nieznacznie wpływające na wynik amplifikacji DNA), ilość produktu w przybliżeniu ulega podwojeniu podczas każdej rundy powielania. Dlatego $100 \cdot 10^{-9}$ g $= 2^N \cdot 5{,}5 \cdot 10^{-19}$ g, gdzie N — liczba cykli reakcji amplifikacji. Rozwiązując to równanie dla $N = \log(1{,}81 \cdot 10^{11})/\log 2$ uzyskujemy $N = 37{,}4$. Tak więc zaledwie około 40 cykli PCR wystarczy, by pojedynczą cząsteczkę powielić do ilości, którą łatwo manipulować i analizować biochemicznie. Cała ta procedura trwa tylko ok. 4 godz.

Odpowiedź 10-7. Podobnie jak olbrzymia większość innych genów kodujących białka u ssaków, gen „atraktazy” prawdopodobnie zawiera introny. Bakterie nie mają aparatu potrzebnego do usuwania intronów i dlatego nie mogło dojść do poprawnej ekspresji tego genu. Ekspresja większości eukariotycznych genów w komórkach bakterii wymaga użycia tych genów w wersji cDNA.

Odpowiedź 10-8

A. Nieprawdziwe. Miejsca restrykcyjne występują na całej długości DNA, to znaczy zarówno w obrębie genów jak i pomiędzy nimi.

B. Prawdziwe. DNA na każdym fosforanie ma jeden ładunek ujemny, co nadaje całej cząsteczce znaczny ładunek ujemny.
C. Nieprawdziwe. Klony pochodzące z bibliotek cDNA nigdy nie zawierają sekwencji promotorowych. Sekwencje te nie ulegają transkrypcji i dlatego nie są częścią mRNA wykorzystywanych jako matryce do przygotowania cDNA.
D. Prawdziwe. Każda reakcja polimeryzacji prowadzi do dwuniciowego DNA, który w każdym cyklu musi być zdenaturowany, aby z pojedynczymi łańcuchami mogły związać się nowe startery potrzebne do ich replikacji.
E. Nieprawdziwe. Trawienie genomowego DNA nukleazami restrykcyjnymi rozpoznającymi czteronukleotydowe sekwencje prowadzi do fragmentów o *przeciętnej* długości 256 nukleotydów. Długość konkretnych fragmentów znacznie się różni (w obu kierunkach) od wartości przeciętnej.
F. Prawdziwe. Najpierw potrzebna jest odwrotna transkryptaza do skopiowania mRNA na jednoniciowy DNA, następnie polimeraza DNA do syntezy drugiej nici DNA.
G. Prawdziwe. Używając dostatecznej liczby sekwencji VNTR, można od poszczególnych osobników uzyskać unikatowy odcisk DNA, podobnie jak odcisk palca.
H. Prawdziwe. Jeśli w komórkach danej tkanki badany gen nie ulega transkrypcji, to nie będzie on reprezentowany w bibliotece cDNA przygotowanej z tej tkanki. Gen będzie jednak się znajdował w bibliotece genomowej z tej samej tkanki.

Odpowiedź 10-9

A. Sekwencję DNA od jego końca 5' do końca 3' odczytuje się od dołu żelu, dokąd migrują najmniejsze fragmenty DNA. Każde pasmo (prążek) powstaje w wyniku przyłączenia odpowiedniego dideoksyrybonukleotydu i — zgodnie z oczekiwaniem — nie ma dwóch prążków o identycznej ruchliwości. Umożliwia to określenie sekwencji DNA przez odczytywanie prążków w kolejności ich układania się, poczynając od dołu żelu i przypisanie im odpowiedniego nukleotydu stosownie do ścieżki, w jakiej występują prążki. Sekwencja nukleotydowa górnego łańcucha (rys. O10-9A) została odczytana z rysunku P10-9, a sekwencję łańcucha dolnego wydedukowano kierując się regułami tworzenia się par zasad.
B. Sekwencję DNA można przetłumaczyć na sekwencję aminokwasową białka kierując się regułami kodu genetycznego. Istnieją jednakże dwa łańcuchy DNA, które mogą ulegać transkrypcji na RNA i translacji do białka i ponadto trzy możliwe ramki odczytu dla każdego z łańcuchów DNA. Dlatego istnieje sześć możliwych sekwencji aminokwasowych, które w zasadzie mogłyby być kodowane przez ten odcinek DNA. Spośród trzech ramek odczytu możliwych dla górnego łańcucha, tylko jedna nie jest przerwana kodonem stop (rys. O10-9B). Dwie spośród trzech możliwych ramek odczytu łańcucha dolnego też zawierają kodony stop (nie pokazane). Trzecia ramka odczytu daje następującą sekwencję:

SerAlaLeuGlySerSerGluAsnArgProArgThrProAlaArgThrGlyCysProValIle

Na podstawie dostępnych informacji w tym przypadku nie jest możliwe określenie, która z dwóch „otwartych ramek odczytu" aktualnie odpowiada białku kodowanemu przez ten odcinek DNA.

Odpowiedź 10-10

A. Trawienie genomowego DNA człowieka enzymem Hae III prowadziłoby do uzyskania ok. $11 \cdot 10^6$ różnych fragmentów ($= 3 \cdot 10^9/4^4$), trawienie przez Eco RI dostarczy ok. 730000 fragmentów ($= 3 \cdot 10^9/4^6$), a trawienie enzymem Not I ok. 46000 różnych fragmentów ($= 3 \cdot 10^9/4^8$). Powstaną także pewne dodatkowe fragmenty, ponieważ chromosomy pochodzące od matki i od ojca są bardzo podobne, ale nie identyczne.
B. Powstanie zespół częściowo nakładających się fragmentów DNA. Biblioteki konstruowane z zespołów pokrywających się fragmentów są wartościowe, gdyż mogą służyć do ułożenia klonowanych fragmentów DNA w takiej samej kolejności, w jakiej występują w chromosomach, a tym samym do ustalenia sekwencji nukleotydowej długich odcinków DNA. Sekwencje pochodzące z końca jednego klonowanego fragmentu są wykorzystywane jako sondy hybrydyzacyjne do wyszukania w bibliotece innych klonów zawierających te sekwencje, a więc takich, które częściowo pokrywają się z klonem pierwszym. Przez powtarzanie tej procedury można stopniowo poukładać poszczególne klony w długie ciągłe sekwencje DNA (patrz pytanie 10-16, s. 345). Tę pracochłonną technikę wędrowania wzdłuż chromosomu stosowano do określenia sekwencji obszarów chromosomów, które zawierają ważne geny, ale w odniesieniu do których nie było żadnych wcześniejszych informacji dotyczących struktury pierwszorzędowej. Przez staranną analizę sekwencji nukleotydowych uzyskanych dzięki wędrówce wzdłuż chromosomu — można było określić położenie i sekwencje odcinków, mogących stanowić tego rodzaju ważne geny.

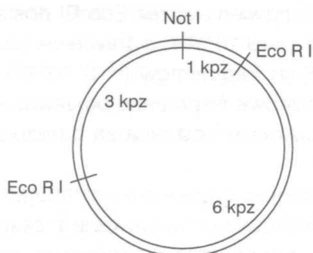
Odpowiedź 10-11. Porównując położenie markerów wielkości z położeniem produktów trawienia DNA nukleazami restrykcyjnymi możemy stwierdzić, że Eco RI daje dwa fragmenty o długości 4 kpz i 6 kpz, Not I — jeden fragment o długości 10 kpz, a Eco RI i Not I użyte równocześnie dają fragmenty 6 kpz, 3 kpz i 1 kpz, co razem stanowi 10 kpz, czyli sumę wszystkich fragmentów w danej ścieżce. Wyjściowa cząsteczka DNA ma więc długość 10 kpz (10000 nukleotydów). Ponieważ trawienie enzymem Not I daje fragment o długości 10 kpz, można by przyjąć, że cząsteczka ta nie ma miejsca rozcinanego przez

```
(A)   5 -TATAAACTGGACAACCAGTTCGAGCTGGTGTTCGTGGTCGGTTTTCAGAAGATCCTAACGCTGACG-3
      3 -ATATTTGACCTGTTGGTCAAGCTCGACCACAAGCACCAGCCAAAAGTCTTCTAGGATTGCGACTGC-5

(B)     koniec 5' nici DNA                                                      3'
        TATAAACTGGACAACCAGTTCGAGCTGGTG TTCGTGGTCGGTTTTCAGAAGATCCTAACGCTGACG
      1 LeuLysLeuGluAsnGlnPheGlnLeuVal PheValValGlyPheGlnLysIleLeuThrLeuThr
      2  IleAsnTrpThrThrSerSerSerTrpCy sSerTrpSerValPheArgArgSer    Arg
      3      ThrGlyGlnProValArgAlaGlyV alArgGlyArgPheSerGluAspProAsnAlaAsp
```

Rys. O10-9

Not I. Ewentualność tę musimy jednak wyeliminować ze względu na rezultat otrzymany z równoczesnego trawienia przez Eco RI + Not I. Wiemy, że trawienie tylko enzymem Eco RI prowadzi do powstania 2 fragmentów o długości 6 i 4 kpz, oraz że fragment 4 kpz jest trawiony dalej przez Not I na fragmenty 3 kpz i 1 kpz. Badany DNA zawiera więc miejsce rozpoznawane przez Not I, czyli musi być cząsteczką kolistą, gdyż po trawieniu tym enzymem uzyskuje się tylko jeden (liniowy) fragment o długości 10 kpz. Rysunek O10-11 pokazuje położenie na kolistej cząsteczce DNA poszczególnych miejsc restrykcyjnych, umożliwiających uzyskanie fragmentów o wielkości zgodnej z wynikami eksperymentu.



Rys. O10-11

Odpowiedź 10-12. Jeśli enzymy naprawcze będą działały na plazmid zanim ulegnie on replikacji, to istotnie po wprowadzeniu do komórek zostanie on naprawiony. Enzymy naprawcze nie mogą jednak rozpoznać, która z nici zawiera mutację, a która normalny nukleotyd. Dlatego w połowie komórek transformowanych wyjściowym plazmidem zostanie odtworzony normalny gen, podczas gdy w drugiej połowie komórek normalna nić ulegnie zmianie i w ten sposób zostanie utrwalona mutacja. Komórki zawierające pożądaną mutację można zidentyfikować, na przykład w drodze hybrydyzacji z jednoniciową sondą DNA, która umożliwia odróżnienie genu normalnego od zmutowanego.

Odpowiedź 10-13

A. Kod genetyczny jest zdegenerowany i dlatego dla każdego aminokwasu istnieje więcej niż jeden kodon, z wyjątkiem tryptofanu i metioniny. Toteż w celu wykrycia sekwencji nukleotydowej znanej jedynie z sekwencji aminokwasowej kodowanego białka — trzeba przygotować pulę wielu oligonukleotydów, by mieć pewność, że ich mieszanina zawiera jeden oligonukleotyd dokładnie komplementarny do fragmentu poszukiwanego genu. Na podstawie trzech sekwencji aminokwasowych przedstawionych w zadaniu należy przygotować następujące sondy (w nawiasach podano alternatywne nukleotydy zajmujące tę samą pozycję w oligonukleotydzie):

Peptyd 1: 5'-TGGATGCA(C,T)CA(C,T)AA(A,G)-3'.

Ze względu na trzy miejsca dwukrotnych degeneracji, potrzebnych byłoby osiem (= 2^3) różnych oligonukleotydów.

Peptyd 2: 5'-(T,C)T(G,A,T,C)(A,T)(G,C)(G,A,T,C)(A,C)G-(G,A,T,C)(T,C)T(G,A,T,C)(A,C)G(G,A,T,C)-3'.

Mieszanina oligonukleotydów reprezentująca peptyd #2 jest znacznie bardziej skomplikowana. Leu, Ser i Arg mają po sześć różnych kodonów; należałoby więc zsyntetyzować mieszaninę 7776 (= 6^5) różnych oligonukleotydów. Nie można jednak tego zrobić po prostu przez użycie więcej niż jednego nukleotydu w każdej z pozycji sondy, ponieważ różne zasady w każdym kodonie nie są niezależne. (Na przykład kodony dla Ser w pierwszej pozycji kodonu mają A lub T, w drugiej G lub C a w trzeciej G, A, T lub C; jeśli jednak pierwszą zasadą jest A, to drugą zasadą kodonu jest zawsze G a trzecią zasadą może być tylko T lub C.)

Peptyd 3: 5'-TA(C,T)TT(C,T)GG(G,A,T,C)ATGCA(A,G)-3'

Ze względu na trzy pozycje dwukrotnie zdegenerowane i jedną czterokrotnie, potrzebnych będzie 32 (= $2^3 \cdot 4$) różnych sekwencji oligonukleotydowych.

Do przeszukania biblioteki drogą hybrydyzacji jako pierwsza prawdopodobnie zostanie użyta sonda #1. Ponieważ sonda ta zawiera tylko 8 różnych sekwencji, stosunek poprawnej sekwencji do sekwencji niewłaściwych jest największy, dzięki czemu podczas przesiewowego testowania biblioteki powstanie silny sygnał. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że pożądana sekwencja znajduje się wśród sekwencji izolowanych na tej podstawie z biblioteki (patrz pytanie 10-5, s. 329). Sonda #2 jest praktycznie nieużyteczna, gdyż tylko 1/7776 część sekwencji w niej zawartych będzie tworzyć dokładny hybryd z poszukiwanym genem. Wyizolowane poprzednio sekwencje można by ponownie zbadać z wykorzystaniem sondy #3. Te sekwencje, które hybrydyzują z sondami #1 i #3 najprawdopodobniej zawierają poszukiwany gen.

B. Informacja, że peptyd #3 zawiera końcowy aminokwas jest ważna, gdyż oznacza, że pozostałe dwa peptydy poprzedzają peptyd trzeci, czyli są ulokowane bliżej końca aminowego w białku. Znajomość tej kolejności jest o tyle istotna, że podczas syntezy DNA startery mogą być wydłużane tylko od ich końca 3'. Do reakcji PCR dwa startery muszą być skierowane ku sobie końcami 3' (patrz rys. 10-22). Starter do reakcji PCR oparty na sekwencji peptydu #3 musi dlatego być komplementarny do sondy #3 (tak by jego koniec 3' odpowiadał pierwszemu nukleotydowi sekwencji komplementarnej do kodonu Trp):

5'-(T,C)TGCAT(G,A,T,C)CC(G,A)AA(G,A)TA-3'

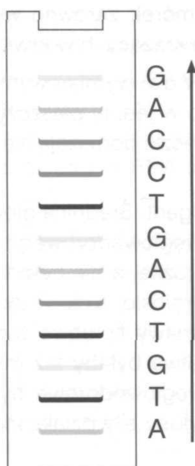
Drugim starterem powinna być sonda #1. Sonda #2 stanowiłaby zły wybór ze względu na jej duży stopień degeneracji.

C. Końce produktu amplifikacji pochodzą od starterów, z których każdy miał długość 15 nukleotydów. Wynika stąd, że powielano odcinek genu o długości 270 nukleotydów. Odcinek taki koduje 90 aminokwasów; dodając do tego aminokwasy kodowane przez startery, uzyskujemy sekwencję kodującą 100 aminokwasów. Prawdopodobnie nie stanowi to całego białka, ponieważ nie znamy lokalizacji peptydu #1 w sekwencji kompletnego białka. Można jednak z satysfakcją zauważyć, że CTATCACGCTTTAGG koduje sekwencję peptydu #2. Obserwacja ta potwierdza, że produkt PCR istotnie koduje fragment wyizolowanego białka.

Odpowiedź 10-14. Chemia białek pozostaje ważną dziedziną, ponieważ stanowi łącznik między sekwencją aminokwasów (którą można wydedukować na podstawie znajomości sekwencji DNA) a funkcjonalnymi właściwościami białek. Na przykład na podstawie sekwencji aminokwasów łańcucha

polipeptydowego nie można przewidzieć sposobu jego fałdowania się, tak więc w wielu przypadkach nie można wydedukować funkcji białka, takiej jak aktywność enzymatyczna, lecz trzeba ją określić eksperymentalnie przez analizę biochemiczną właściwości białka. Ponadto informacje strukturalne dedukowane na podstawie sekwencji DNA nie są kompletne. Na przykład nie można na tej drodze uzyskać informacji o modyfikacjach łańcuchów bocznych reszt aminokwasów (np. o fosforylacji), proteolitycznych zmianach potranslacyjnych, obecności silnie związanych koenzymów lub asocjacji białka z innymi łańcuchami polipeptydowymi.

Odpowiedź 10-15. Produktem reakcji będzie duża ilość różnych jednoniciowych cząsteczek DNA, odpowiadająca liczbie nukleotydów w sekwencjonowanej matrycy. Produkty te będą wykazywały cztery różne kolory, w zależności od tego, który z czterech dideoksyrybonukleotydów zakończył reakcję polimeryzacji danego łańcucha DNA. Rozdział metodą elektroforezy żelowej doprowadzi do utworzenia się drabinki prążków. Kolor prążka będzie wskazywał rodzaj nukleotydu w matrycy, a położenie prążka na żelu — pozycję tego nukleotydu w sekwencjonowanej matrycy. Metoda tutaj opisana stanowi podstawę strategii stosowanej w większości aparatów do automatycznego sekwencjonowania DNA (rys. O10-15).



Rys. O10-15

Odpowiedź 10-16

A. Klony cDNA nie nadają się do tego celu, ponieważ ich sekwencje nie zachodzą na siebie, nawet jeśli cDNA pochodzi z genów sąsiadujących ze sobą na chromosomie.
B. Powtarzające się sekwencje zaciemniają wyniki wędrówki po chromosomie, ponieważ wydawałoby się, że istnieje wiele punktów rozgałęzienia drogi wędrówki. Strategia unikania tego rodzaju problemów polega na ogół na wykorzystywaniu takich klonów genomowych, których długość znacznie przekracza długość odcinków o powtarzającej się sekwencji.

Odpowiedź 10-17. Zmutowane bakterie, nie wytwarzające białka lodowego, prawdopodobnie wielokrotnie powstawały w warunkach naturalnych. Jednak bakterie, które wytwarzają to białko, wykazują pewną przewagę nad bakteriami nie tworzącymi go, byłoby więc trudno znaleźć dzikie mutanty nie wytwarzające tego białka (w długim czasie prawdopodobnie mutantom byłoby trudno konkurować z naturalnymi szczepami tworzącymi białko lodowe). Inżynieria genetyczna, wykorzystując geny celowo zmutowane *in vitro*, pozwala po prostu znacznie łatwiej uzyskać odpowiednie mutanty. Konsekwencje wykorzystania organizmów genetycznie zmienionych metodami inżynierii genetycznej, zarówno korzystne jak i niekorzystne, prawie nie dają się odróżnić od konsekwencji wynikających z wykorzystania naturalnych mutantów. W istocie szczepy bakterii i drożdży przez wieki selekcjonowano pod kątem cech genetycznych przydatnych do zastosowań na skalę przemysłową, takich jak produkcja serów lub wina. Możliwości inżynierii genetycznej są nieskończone, jednak podobnie jak w przypadku innych technologii, istnieje określone ryzyko pojawienia się nieprzewidywalnych efektów. Eksperymentowanie z rekombinowanym DNA podlega dlatego regulacjom prawnym, a ryzyko stwarzane przez poszczególne projekty jest starannie oceniane przez zespoły opiniodawców przed udzieleniem zgody na realizację projektu. Stan naszej wiedzy jest dostateczny, by przewidzieć z rozsądną pewnością konsekwencje niektórych zmian genetycznych, takich jak nokaut genu w omawianym przykładzie. Inne możliwe zastosowania, np. terapia genowa komórek linii płciowej w celu usunięcia chorób człowieka, mogą mieć bardziej złożone skutki i upłynie wiele lat badań oraz dyskusji nad etyczną stroną zagadnienia, zanim dojdzie do ich ewentualnej realizacji.

Rozdział 11

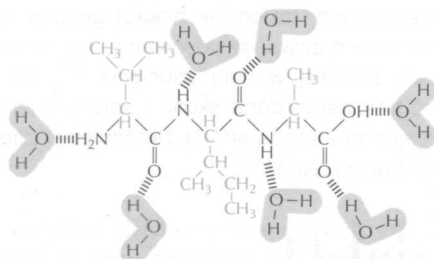
Odpowiedź 11-1. Woda jest płynem, a więc wiązania wodorowe między cząsteczkami wody nie są statyczne; ciągle się tworzą i znów rozpadają działaniem ruchów termicznych. Gdy cząsteczka wody znajdzie się w pobliżu cząsteczki hydrofobowej, jej ruch jest bardziej ograniczony; ma też mniej sąsiadów, z którymi może oddziaływać, ponieważ nie może tworzyć żadnych wiązań wodorowych skierowanych do cząsteczki hydrofobowej. Dlatego też będzie tworzyć wiązania wodorowe z bardziej ograniczoną liczbą cząsteczek wody w swym pobliżu. Wiązanie się z mniejszą ilością partnerów prowadzi do powstania bardziej uporządkowanej struktury wody, którą przedstawiono na rys. 11-9 jako strukturę podobną do klatki. Strukturę tę przyrównuje się do lodu, aczkolwiek jest ona siatką bardziej przejściową, mniej zorganizowaną i mniej rozległą niż najmniejszy nawet kryształek lodu. Utworzenie jakiejkolwiek uporządkowanej struktury obniża entropię układu (patrz rozdz. 3), co jest energetycznie niekorzystne.

Odpowiedź 11-2. Prawidłową analogią do powstawania dwuwarstwy lipidowej jest sytuacja (B), ponieważ w grę wchodzi wyłączenie cząsteczek lipidów poza obręb wody, a nie siły przyciągania między nimi. Gdyby cząsteczki lipidów tworzyły między sobą wiązania, dwuwarstwa byłaby mniej płynna, a nawet mogłaby się stać sztywna, w zależności od siły oddziaływań.

Odpowiedź 11-3. Płynność dwuwarstwy jest ściśle ograniczona do jednej płaszczyzny: cząsteczki lipidów mogą dyfundować bocznie, ale niełatwo im przeskoczyć ruchem „flip” z jednej monowarstwy do drugiej. Dlatego też specyficzne typy cząsteczek lipidów wprowadzone do danej monowarstwy pozostają w niej, jeśli nie zostaną przeniesione aktywnie przez enzym — flipazę.

Odpowiedź 11-4. Zarówno w α helisie jak i beczułce β polarne wiązania peptydowe łańcucha polipeptydowego mogą być — przez hydrofobowe łańcuchy boczne aminokwasów — całkowicie osłonięte przed hydrofobowym otoczeniem dwuwarstwy lipidowej. Struktura α helisy i beczułki β jest stabilizowana przez wewnętrzne wiązania wodorowe tworzące się pomiędzy wiązaniami peptydowymi.

Odpowiedź 11-5. Grupa siarczanowa w SDS ma ładunek elektryczny i dlatego jest hydrofilowa. Grupa OH i grupy C—O—C w Trytonie X-100 są polarne; mogą one tworzyć z wodą wiązania wodorowe i dlatego są hydrofilowe. Natomiast części cząsteczek zaznaczone kolorem *zielonym* są albo łańcuchami węglowodorowymi, albo pierścieniami aromatycznymi; żadne z nich nie mają grup polarnych, które mogłyby się wiązać wiązaniami wodorowymi z cząsteczkami wody i dlatego są one hydrofobowe (patrz rys. O11-5).



Rys. O11-5

Odpowiedź 11-6. α helisa jest najczęstszą formą, w jakiej białka są wbudowane w dwuwarstwę lipidową. Struktura ta jest do tego celu dobrze dostosowana, ponieważ eksponuje hydrofobowe łańcuchy boczne aminokwasów do hydrofobowego wnętrza dwuwarstwy lipidowej, a polarne wiązania peptydowe łańcucha polipetydowego utrzymuje z dala od fazy hydrofobowej (patrz rys. od 11-23 do 11-26). Istnieją jednak inne, mniej regularne sposoby zwinięcia łańcucha polipeptydowego, dające ten sam wynik, co właśnie widać w przypadku małej pętli w centrum reakcji fotosyntetycznej. Przykład ten ilustruje, jak wielką wagę ma wyznaczenie struktury trójwymiarowej, która znana jest, jak dotąd, dla niewielu tylko białek błonowych.

Odpowiedź 11-7. Pewne cząsteczki dwóch różnych białek transbłonowych są zakotwiczone do filamentów spektryny kory komórki. Cząsteczki te nie mogą swobodnie ani obracać się, ani dyfundować w obrębie płaszczyzny błony. Jednakże dostępnych miejsc przyłączenia w korze jest mniej niż białek transbłonowych, tak iż niektóre z cząsteczek tych białek nie są zakotwiczone, ale swobodnie obracają się i dyfundują w obrębie płaszczyzny błony. Pomiary ruchliwości białek wykazują, że rzeczywiście istnieją dwie różne populacje każdego białka transbłonowego, odpowiadające białkom zakotwiczonym i tym, które zakotwiczone nie są.

Odpowiedź 11-8. Różne sposoby ograniczające występowanie białek błonowych do określonych obszarów błony zestawiono na rys. 11-36. Ruchliwość białek błonowych jest drastycznie zredukowana przez związanie ich z innymi białkami, takimi jak białka cytoszkieletu lub matriks międzykomórkowej. Natomiast ograniczenie występowania białek tylko do pewnych domen błony, przez takie bariery jak złączenia zamykające, nie wpływa na ruchliwość białek. Zakotwiczenie białek błonowych nie wpływa znacząco na płynność dwuwarstwy lipidowej; morze cząsteczek lipidowych opływa zakotwiczone białka błonowe tak jak woda opływa pale pomostu.

Odpowiedź 11-9. Wszystkie twierdzenia są poprawne.

A., B., C., D. Dwuwarstwa lipidowa jest płynna właśnie dlatego, że cząsteczki lipidów w dwuwarstwie mogą wykonywać te ruchy.

E. Umiejscowienie glikolipidów jest z reguły ograniczone do tej monowarstwy błony, która nie jest skierowana do cytozolu. Jednak specjalne glikolipidy, takie jak fosfatydyloinozytol (omawiany w rozdz. 15), występują specyficznie w cytozolowej warstwie dwuwarstwy.

F. Zredukowanie podwójnych wiązań (przez uwodorowanie) pozwala cząsteczkom lipidów na ciaśniejsze ułożenie się przy sobie, co zwiększa lepkość; w tym przypadku zamienia olej w margarynę.

G. Przykładami są enzymy biorące udział w przekazywaniu informacji (o czym będzie mowa w rozdz. 15).

H. Polisacharydy są głównymi składnikami śluzu i śliny; glikokaliks zbudowany z poli- i oligosacharydów jest ważnym czynnikiem zwiększającym śliskość powierzchni, np. w przypadku komórek zarówno wyścielających naczynia krwionośne, jak i krążących w krwiobiegu.

Odpowiedź 11-10. W dwuwymiarowym płynie cząsteczki mają swobodę ruchu tylko w jednej płaszczyźnie; natomiast w normalnym płynie cząsteczki poruszają się w trzech wymiarach.

Odpowiedź 11-11

A. Mielibyśmy detergent. Średnica głowy lipidu byłaby znacznie większa niż węglowodorowego ogona tak, iż komórka miałaby kształt stożka, a nie cylindra, przez co cząsteczki agregowałyby w micele, a nie w dwuwarstwy.

B. Powstałe dwuwarstwy lipidowe byłyby znacznie bardziej płynne. Dwuwarstwa byłaby też mniej stabilna, ponieważ krótsze ogony węglowodorowe byłyby mniej hydrofobowe, co zmniejszyłoby siły działające w kierunku tworzenia dwuwarstwy.

C. Utworzone dwuwarstwy lipidowe byłyby znacznie mniej płynne. Gdy normalna dwuwarstwa lipidowa ma lepkość oleju z oliwek, to dwuwarstwa zbudowana z tych samych lipidów, ale o ogonach węglowodorowych o nasyconych wiązaniach miałaby konsystencję smalcu.

D. Utworzone dwuwarstwy lipidowe byłyby znacznie bardziej płynne. Zarazem, ze względu na gorsze upakowanie lipidów miałyby więcej przerw i byłyby bardziej przepuszczalne dla małych cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie.

E. Jeśli założymy, że cząsteczki lipidów zostaną całkowicie wymieszane, płynność błony nie ulegałaby zmianie, jednak w takich dwuwarstwach cząsteczki nasyconych lipidów, które mogą upakowywać się ciaśniej, miałyby tendencję do agregowania ze sobą i dlatego tworzyłyby łatki o znacznie zredukowanej płynności. Dlatego też dwuwarstwa nie miałaby na swej powierzchni jednolitych właściwości. Ponieważ prawidłowo do tej samej hydrofilowej głowy cząsteczki lipidu jest przyłączony jeden nienasycony i jeden nasycony łańcuch węglowodorowy, segregacja taka nie występuje w błonach komórki.

F. Utworzona dwuwarstwa lipidowa miałaby pozornie nie zmienione właściwości. Każda cząsteczka lipidu sięgałaby

od jednej strony błony do drugiej, wystawiając po jednej ze swych dwóch grup hydrofilowych na każdej powierzchni błony. Takie cząsteczki lipidów występują u bakterii termofilnych, które mogą żyć prawie w temperaturze wrzenia wody. Przy podwyższonych temperaturach ich dwuwarstwy nie rozchodzą się, jak się to dzieje z innymi dwuwarstwami, ponieważ oryginalnie dwie monowarstwy są teraz kowalencyjnie związane w jedną.

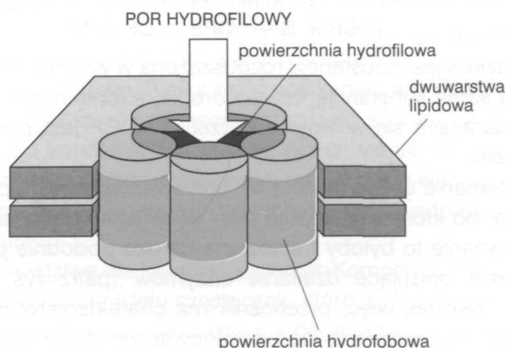
Odpowiedź 11-12. Cząsteczki lipidów mają kształt w przybliżeniu cylindryczny, natomiast cząsteczki detergentu mają kształt stożka lub klina. Cząsteczka lipidu o jednym tylko ogonie węglowodorowym mogłaby więc być detergentem. Aby *uczynić z cząsteczki lipidu detergent, musielibyśmy albo* powiększyć jej hydrofilową głowę, albo usunąć jeden z ogonów, przez co cząsteczki takie mogłyby utworzyć micelę. Cząsteczki detergentu mają również zazwyczaj ogony węglowodorowe krótsze niż te, które występują w cząsteczkach lipidów. Nadaje im to nieco większą rozpuszczalność w wodzie, przez co cząsteczki detergentu mogą w roztworach wodnych częściej wchodzić do micel i je opuszczać. Właśnie z tego względu w wodnym roztworze detergentu zawsze będą obecne pewne monomerowe jego cząsteczki, które mogą wejść do dwuwarstwy lipidowej i dokonać solubilizacji białek błonowych (patrz rys. 11-28).

Odpowiedź 11-13. Zdolność przenikania przez błonę w porządku malejącym jest (wg właściwości cząsteczek) następująca: N_2 (mała i niepolarna) > etanol (mała i nieco polarna) > woda (mała i polarna) > glukoza (duża i polarna) > > Ca^{2+} (mała i z ładunkiem) > RNA (bardzo duża i z ładunkiem).

Odpowiedź 11-14. Pomiędzy cząsteczką lipidu z jednego końca bakterii a drugą cząsteczką na przeciwnym końcu bakterii mieści się w ułożeniu liniowym ok. 4000 lipidów (każdy o szerokości 0,5 nm). Jeśli więc cząsteczka z jednego końca bakterii rozpoczęłaby się przemieszczać w kierunku drugiego końca, wymieniając się miejscami z sąsiadującymi cząsteczkami co 10^{-7} sekundy, to osiągnięcie drugiego końca zajęłoby jej tylko $4 \cdot 10^{-4}$ sekundy (= $4000 \cdot 10^{-7}$ s). Jednakże w rzeczywistości cząsteczka lipidu nie będzie się poruszała w określonym kierunku, ale w kierunkach przypadkowych, przez co osiągnięcie drugiego końca bakterii zajmie jej znacznie więcej czasu (1 s). Jeśli piłeczka pingpongowa o średnicy 4 cm wymieniałaby się z piłeczkami sąsiadującymi co 10^{-7} sekundy, wędrowałaby z szybkością 1 440 000 km/godz. (= 4 cm/10^{-7} s). Gdyby ruch jej był prostoliniowy, osiągnęłaby przeciwną ścianę w ciągu $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ sekundy; przy ruchu przypadkowym zajmie jej to znacznie więcej czasu (~ 2 ms).

Odpowiedź 11-15. Białka błonowe łączą dwuwarstwę lipidową z cytoszkieletem, co tak dalece wzmacnia błonę komórkową, że może ona oprzeć się działającym na nią siłom tak dużym, jakim jest poddany erytrocyt przepychany ciśnieniem krwi przez naczynia włosowate. Białka błonowe transportują również przez błonę komórkową substancje odżywcze i jony.

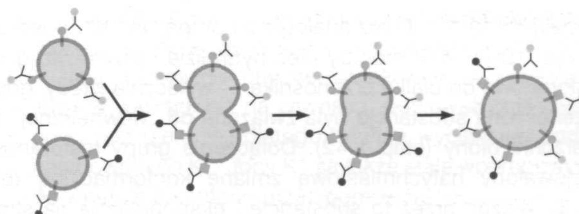
Odpowiedź 11-16. Uważa się, że hydrofilowe powierzchnie pięciu α helis transbłonowych, z których każda należy do różnych podjednostek, zestawiają się ze sobą, tworząc w poprzek dwuwarstwy lipidowej por wyścielony hydrofilowymi bocznymi łańcuchami aminokwasów. Przez ten hydrofilowy por mogą przechodzić jony. Hydrofobowe boczne łańcuchy aminokwasów na pozostałych powierzchniach α helis oddziałują z hydrofobowymi ogonami lipidów w dwuwarstwie.



Rys. O11-16

Odpowiedź 11-17. Na każdą cząsteczkę białka w błonie przypada 100 cząsteczek lipidów (tj. fosfolipidu + cholesterolu) [= (2·50000) / (800 + 386)].

Odpowiedź 11-18. Fuzja błon nie zmienia zorientowania białek błonowych z przyczepionymi do nich „kolorowymi metkami". Ta część każdego białka transbłonowego, która jest eksponowana do cytozolu, zawsze taka pozostanie, a część eksponowana na zewnątrz komórki zawsze taką pozycję zachowa. W temperaturze 0°C płynność błony jest zmniejszona, a mieszanie się białek błonowych znacząco spowolnione.



Rys. O11-18

Odpowiedź 11-19. Eksponowanie hydrofobowych bocznych łańcuchów aminokwasów ku wodzie jest energetycznie niekorzystne. Istnieją dwa sposoby odsunięcia takich łańcuchów bocznych od wody, umożliwiające osiągnięcie stanu bardziej korzystnego energetycznie. Po pierwsze, łańcuchy takie mogą wytworzyć domeny transbłonowe ulokowane w dwuwarstwie lipidowej pomiędzy dwoma jej powierzchniami. Wymaga to jednak ciągu ok. 20 takich aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Po drugie, hydrofobowe łańcuchy boczne aminokwasów mogą zostać schowane we wnętrzu sfałdowanego łańcucha polipeptydowego. Jest to jedna z głównych sił, które splatają łańcuch polipetydowy w niepowtarzalną strukturę trójwymiarową. W obu przypadkach oddziaływania hydrofobowe — zarówno w dwuwarstwie lipidowej, jak i we wnętrzu białka — są oparte na tych samych zasadach.

Rozdział 12

Odpowiedź 12-1

A. Transport przebiegający za pośrednictwem przenośników można opisać ściśle analogicznym równaniem



$$(1)\ CP + S \rightleftharpoons CPS \rightarrow CP + S^*$$

gdzie S jest substancją rozpuszczoną w wodzie, S* jest taką samą substancją, ale po drugiej stronie błony (a więc znajdującą się w innym otoczeniu), a CP jest przenośnikiem.

B. Równanie to jest użyteczne, ponieważ opisuje etap wiązania, po którym następuje etap uwolnienia. Matematycznie równanie to byłoby traktowane bardzo podobnie jak równanie opisujące działanie enzymów (patrz rys. 5-27A, s. 169); tak więc, przenośnik ma charakterystyczną wartość K_M, opisującą jego powinowactwo do przenoszonej substancji oraz wartość V_{max}, opisującą maksymalną szybkość, z jaką te cząsteczki przenosi. Dla uściślenia należałoby uwzględnić w schemacie reakcji zmiany konformacyjne przenośnika:



$$(2a)\ CP + S \rightleftharpoons CPS \rightleftharpoons CP^*S^* \rightarrow CP^* + S^*$$



$$(2b)\ CP \rightleftharpoons CP^*$$

gdzie CP* jest przenośnikiem po zmianie konformacyjnej powodującej eksponowanie jego miejsca wiążącego substancję — po drugiej stronie błony. Uwzględnienie tego wymaga drugiego równania (2b), które pozwala przenośnikowi powrócić do jego wyjściowej konformacji.

C. Równanie nie opisuje zachowania kanału, ponieważ rozpuszczone substancje przechodząc przez kanały nie wiążą się z nimi w taki sposób, jak substraty wiążą się z enzymami.

Odpowiedź 12-2. Przez analogię z pompą Na^+-K^+, pokazaną na rys. 12-11, ATP mógłby ulec hydrolizie i przekazać grupę fosforanową do białka przenośnika — wyłącznie wtedy, gdyby przenoszona substancja była związana od „wewnętrznej" powierzchni błony (etap 1→2). Dołączenie grupy fosforanowej inicjowałoby natychmiastową zmianę konformacyjną (etap 2→3), wiążąc przez to substancję i eksponując ją na stronę „zewnętrzną". Grupa fosforanowa byłaby usuwana z białka wyłącznie po oddysocjowaniu przenoszonej substancji, a wtedy już pusty, nieufosforylowany przenośnik przestawiłby się w konformację wyjściową (etap 3→4) (rys. O12-2, poniżej).

Odpowiedź 12-3

A. Właściwości definiują białko symportowe.

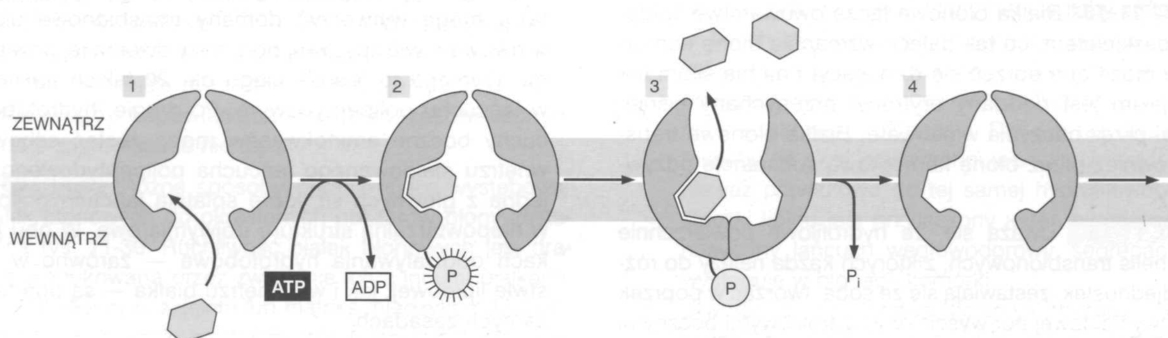
B. Nie ma potrzeby precyzowania dodatkowych właściwości. Istotną cechą zapewniającą sprzężenie przenoszenia dwóch substancji rozpuszczalnych jest to, że białko nie może przełączyć swojej konformacji, jeśli jest związana tylko jedna z tych substancji. Substancja B, która napędza transport substancji A, występuje w nadmiarze po tej stronie błony, od której rozpoczyna się transport, i przez większość czasu zajmuje swoje miejsce wiążące. W tym stanie przenośnik, nie mogący jeszcze przełączyć swej konformacji, czeka na moment sporadycznego związania substancji A. Dopiero po związaniu w obu miejscach białko przenośnika przełącza swą konformację. Teraz eksponowane od drugiej strony błony miejsce wiążące dla substancji B jest przeważnie puste, ponieważ substancji tej jest mało w roztworze po tej stronie błony. Aczkolwiek miejsce wiążące dla A jest teraz coraz częściej zajęte, przenośnik może przełączyć swą konformację z powrotem tylko wtedy, gdy zostanie z niego wyładowana również substancja A.

C. Funkcje antyportowe mogłoby pełnić podobnie skonstruowane białko transbłonowe o następujących właściwościach: ma dwa miejsca wiążące, jedno dla substancji A i jedno dla substancji B. Białko może ulegać zmianie konformacyjnej, przełączającej go pomiędzy dwoma stanami, w których: albo oba miejsca wiążące są eksponowane wyłącznie po jednej stronie błony, albo oba miejsca wiążące są eksponowane wyłącznie po drugiej stronie błony. Białko może przełączać się między dwoma stanami konformacyjnymi tylko wtedy, gdy zajęte jest jedno miejsce wiążące, ale nie może się przełączać, gdy oba miejsca wiążące są zajęte lub oba są puste.

Zwróć uwagę, że te zasady dostarczają modelu alternatywnego do tego, który pokazano na rys. 12-13. Tak więc istnieją dwie możliwe drogi sprzężenia transportu dwóch rozpuszczalnych substancji: 1) zapewnienie obecności kooperatywnych miejsc wiążących i umożliwienie pompie przełączania się pomiędzy dwoma stanami w sposób przypadkowy, jak przedstawiono to na rys. 12-13, lub 2) umożliwienie niezależnego wiązania się obu substancji i wytworzenie przełącznika pomiędzy dwoma stanami, uzależnionego od zajęcia miejsc wiążących. Ponieważ struktura sprzężonego przenośnika nie została dotąd poznana, nie wiemy jeszcze, który z tych dwóch mechanizmów jest przez te pompy używany.

Odpowiedź 12-4. Jeśli pompa Na^+-K^+ przyhamowana częściowo przez strofantynę lub digitalis nie pracuje z pełną wydajnością, to tworzony przez nią elektrochemiczny gradient Na^+ jest mniej stromy, niż w komórkach nie poddanych działa-

Rys. O12-2



niu tych środków farmakologicznych. W konsekwencji, antyportowy wymiennik Ca^{2+}-Na^{+} pracuje mniej wydajnie i Ca^{2+} jest usuwany z komórki wolniej. Gdy rozpoczyna się następny cykl skurczu mięśnia, w cytozolu pozostaje jeszcze podwyższony poziom Ca^{2+}. Dlatego też wejście do komórki takiej samej jak normalnie ilości jonów Ca^{2+} doprowadzi do większego stężenia Ca^{2+} niż istniejące zazwyczaj w komórce, co z kolei spowoduje skurcz silniejszy i dłużej trwający. Ponieważ pompa Na^{+}-K^{+} pełni we wszystkich komórkach zwierzęcych istotne funkcje, zarówno utrzymując równowagę osmotyczną, jak i tworząc gradient Na^{+} zasilający wiele białek transportujących, zastosowane w tym przykładzie środki farmakologiczne są w większych stężeniach silnie trujące.

Odpowiedź 12-5. Każdy z prostokątnych wierzchołków odpowiada otwarciu pojedynczego kanału, co umożliwia przepływ słabego prądu. Możesz zauważyć z zapisu, że kanały obecne w łatce błony często otwierają się i zamykają. Każdy kanał pozostaje otwarty na krótki, często zmienny okres, średnio trwający 10 ms. W stanie otwarcia kanały umożliwiają przepływ słabego prądu o jednakowym natężeniu (4 pA; jeden pikoamper = 10^{-12}A). W jednym przypadku prąd uległ podwojeniu, co wskazuje, że dwa kanały otworzyły się równocześnie w tej samej łatce błony. Jeśli nie dodasz acetylocholiny, albo podasz ją do płynu na zewnątrz pipety, będziesz mógł mierzyć tylko prąd podstawowy (tło). Aby kanał mógł się otworzyć, acetylocholina musi się związać z zewnątrzkomórkową domeną cząsteczki receptora acetylocholinowego — a w łatce błony przedstawionej na rys. 12-20 do płynu na zewnątrz mikroelektrody eksponowana jest cytoplazmatyczna strona błony.

Odpowiedź 12-6. Wartość potencjału równowagowego K^{+} wynosi –90 mV [=62 mV $\log_{10}$ (5 mM/140 mM)], a potencjału równowagowego Na^{+} — +72 mV [=62 mV $\log_{10}$ (145 mM/10 mM)]. Dzięki obecności w błonie komórkowej spoczynkowych kanałów K^{+}, w komórce znajdującej się w stanie spoczynkowym K^{+} może osiągnąć równowagę; dlatego potencjał błonowy komórek ma wartość blisko –90 mV. Po otwarciu kanałów Na^{+} jony Na^{+} wpływają do komórki, w wyniku czego potencjał błonowy odwraca swą polarność do wartości zbliżonej do +72 mV, tj. wartości równowagowej dla Na^{+}. Po zamknięciu kanałów Na^{+}, spoczynkowe kanały K^{+} pozwalają na wypływanie jonów K^{+} (które nie są już w równowadze) z komórki tak długo, aż nie zostanie odtworzony potencjał błonowy o wartości równej potencjałowi równowagowemu K^{+}, tj. ok. –90 mV.

Odpowiedź 12-7. Gdy spoczynkowy potencjał błonowy aksonu spada poniżej wartości progowej, bramkowane napięciem kanały Na^{+} w bezpośrednim sąsiedztwie otwierają się i umożliwiają wpływanie Na^{+}. To powoduje dalszą depolaryzację błony, wymuszając otwieranie się również bardziej odległych kanałów Na^{+} bramkowanych napięciem. Wytwarza to falę depolaryzacji, zwaną potencjałem czynnościowym, który błyskawicznie przemieszcza się wzdłuż aksonu. Ponieważ kanały Na^{+} już wkrótce po swoim otwarciu ulegają inaktywacji, przepływ K^{+} przez bramkowane potencjałem kanały K^{+} i spoczynkowe kanały K^{+} jest w stanie szybko odtworzyć wyjściowy potencjał spoczynkowy, zaraz po przejściu potencjału czynnościowego (86 słów).

Odpowiedź 12-8. Gdy liczba działających receptorów acetylocholinowych zostaje zredukowana przez przeciwciała, przekaźnik nerwowy (acetylocholina) uwalniany z zakończenia nerwu nie może pobudzić mięśnia do skurczu (lub pobudza go tylko bardzo słabo).

Odpowiedź 12-9

A. Nieprawdziwe. Błona komórkowa zawiera białka, które mogą się stać selektywnie przepuszczalne dla wielu naładowanych cząsteczek. Natomiast czysta dwuwarstwa lipidowa pozbawiona białek jest wysoce nieprzepuszczalna dla wszystkich naładowanych cząsteczek.

B. Nieprawdziwe. Białka tworzące kanały nie wiążą przechodzących przez nie rozpuszczonych substancji. Selektywność kanału jest uzyskana przez wymiar wewnętrznego poru oraz przez naładowane regiony przy wejściu do poru, które przyciągają lub odpychają jony o odpowiednim ładunku.

C. Prawdziwe dla komórek zwierząt. Komórki zawierają stężone roztwory wielu cząsteczek, które wywołują osmotyczne wnikanie wody. Jeśli jony nie będą ustawicznie wypompowywane w celu utrzymania równowagi osmotycznej, komórki w końcu pękną. Nieprawdziwe — dla komórek roślin, drożdży i bakterii. Aczkolwiek woda i w tych komórkach ma tendencję do wnikania w drodze osmozy, komórki te są otoczone sztywną ścianą komórkową, zapobiegającą pękaniu błony komórkowej.

D. Nieprawdziwe. Przenośniki działają wolniej. Mają one właściwości podobne do cech enzymów, tj. wiążą rozpuszczone substancje i w swym cyklu pracy muszą ulegać zmianom konformacyjnym. To ogranicza maksymalną szybkość transportu do ok. 1000 cząsteczek substancji na sekundę, natomiast przez kanały może przejść do 1 000 000 takich cząsteczek na sekundę.

E. Prawdziwe. W pewnych bakteriach fotosyntetyzujących bakteriorodopsyna przemieszcza H^{+}, używając w tym celu energii pochłoniętego światła widzialnego.

F. Prawdziwe. Większość komórek zwierzęcych ma w swych błonach komórkowych spoczynkowe kanały K^{+}, które pozostają przeważnie otwarte. Stężenie K^{+} w komórce jest zawsze większe niż na zewnątrz, ponieważ potencjał błonowy jest ujemny i dlatego hamuje wyciekanie dodatnio naładowanych K^{+}. Jony K^{+} są także stale wpompowywane do wnętrza z komórki przez pompę Na^{+}-K^{+}.

G. Nieprawdziwe. W symporcie dwie różne rozpuszczone substancje są wiązane do przenośnika po tej samej stronie błony. Odwrócenie tego nie zmieni systemu w antyportowy, który również musi wiązać różne substancje, ale po przeciwnych stronach błony.

H. Nieprawdziwe. Wierzchołek potencjału czynnościowego odpowiada krótkotrwałemu przesunięciu potencjału błonowego z wartości ujemnych do dodatnich. Wnikanie Na^{+} do komórki sprawia, że potencjał błonowy najpierw zmienia swą wartość w kierunku zera, a następnie odwraca jej znak, powodując w komórce wystąpienie ładunku dodatniego od strony cytoplazmy. W końcu zostaje przywrócony potencjał spoczynkowy, w wyniku wypływu K^{+} poprzez bramkowane napięciem kanały K^{+} i spoczynkowe kanały K^{+}.

Odpowiedź 12-10

A. Obydwa systemy transportu sprzęgają przemieszczanie dwóch różnych cząsteczek poprzez błonę. W symporcie obie cząsteczki są transportowane w tym samym kierunku, natomiast w antyporcie są transportowane w kierunkach przeciwnych.

B. Oba typy transportu zachodzą za pomocą błonowych białek transportujących. Bierny transport substancji przebiega energetycznie korzystnie, zgodnie z ich gradientem stężeń lub gradientem elektrochemicznym, natomiast transport aktywny jest energetycznie niekorzystny i dlatego wymaga źródła energii. Aktywny transport mogą prowadzić przenośniki i pompy, ale nie kanały, natomiast transport bierny mogą prowadzić zarówno przenośniki, jak i kanały.

C. Oba terminy opisują zmiany energii biorące udział w przemieszczaniu jonu z jednej strony błony na drugą. Potencjał błonowy jest wyrazem zmiany energii elektrycznej; gradient elektrochemiczny jest wartością złożoną z tej zmiany energii elektrycznej i ze zmiany energii chemicznej związanej z przemieszczaniem jonów między obszarami o ich dużym i małym stężeniu. Potencjał błonowy jest określony niezależnie od rodzaju jonu, natomiast gradient elektrochemiczny zależy od gradientu stężeń określonego jonu i dlatego jest parametrem specyficznym dla przenoszonej substancji.

D. Pompa jest (według specyficznego poglądu autora — *przyp. tłum.*) specjalną formą przenośnika, który używa energii do transportowania rozpuszczonej substancji wbrew jej gradientowi elektrochemicznemu.

E. Oba przesyłają sygnały na zasadzie aktywności elektrycznej. Przewody są wykonane z miedzi, aksony nie. Sygnał przechodzący wzdłuż aksonu nie traci swej siły, ponieważ ulega samowzmocnieniu, natomiast sygnał przechodzący wzdłuż przewodu z metalu traci swą intensywność w miarę wzrostu odległości (w wyniku przecieku prądu poprzez warstwę izolacyjną).

F. Zarówno substancja rozpuszczona pozbawiona ładunku, jak i jon mają wpływ na ciśnienie osmotyczne komórki. Jon jest substancją rozpuszczoną, niosącą na sobie ładunek.

Odpowiedź 12-11. Most pozwala pojazdom na przekraczanie rzeki stałym strumieniem; wjazd na most może być tak zaprogramowany, aby wykluczyć np. ciężarówki o za dużych wymiarach i może być okresowo zamykany dla ruchu bramką. Analogicznie kanały umożliwiają przepływ jonów poprzez błony jako bramkowany strumień z nałożonymi restrykcjami dotyczącymi wielkości i ładunku. Natomiast prom może zostać załadowany pojazdami po jednej stronie rzeki, a następnie po przemieszczeniu się rozładowany na jej drugim brzegu. Ten proces jest wolniejszy. Podczas załadowywania poszczególne pojazdy mogą być wybrane z oczekującej kolejki, ponieważ szczególnie dobrze pasują do pokładu dla pojazdów. Analogicznie przenośniki wiążą rozpuszczone substancje po jednej stronie błony i następnie, po przekształceniu konformacyjnym, uwalniają je po drugiej stronie. Specyficzne wiązanie prowadzi do selekcji cząsteczek, które mają być przeniesione. Podobnie jak w przypadku transportu sprzężonego, czasami trzeba czekać na odjazd promu, dopóki się on nie zapełni.

Odpowiedź 12-12. Acetylocholina jest przenoszona do pęcherzyków przez znajdujący się w błonie pęcherzyka antyportowy przenośnik H^+-acetylocholina. Gradient H^+, napędzający ten transport, jest tworzony przez zawartą w błonie pęcherzyków ATPazową pompę H^+, która pompuje H^+ do wnętrza pęcherzyków (stąd zależność tej reakcji od ATP). Podwyższenie pH płynu otaczającego pęcherzyki zwiększa gradient H^+: przy podwyższonym pH w płynie otaczającym pęcherzyki ilość jonów H^+ zmniejsza się, natomiast ich ilość wewnątrz pęcherzyka pozostaje bez zmiany. To wyjaśnia obserwowane zwiększenie szybkości pobierania acetylocholiny.

Odpowiedź 12-13. Gradient napięcia w poprzek błony wynosi ok. 150 000 V/cm. To niezwykle silne pole elektryczne jest bliskie granicy, przy której materiały izolacyjne — takie jak dwuwarstwa lipidowa — rozpadają się i przestają działać jako izolatory. Duże pole odpowiada dużej ilości energii, która może być zmagazynowana w gradientach elektrycznych istniejących w poprzek błony i jest powodem, dla którego białka w błonie mogą być poddane ogromnym siłom elektrycznym. Napięcie 150 000 V doprowadzi do powstania łuku elektrycznego pomiędzy elektrodami o odstępie 1 cm (tzn., że przy tej sile pola powietrze nie będzie już wystarczającym izolatorem).

Odpowiedź 12-14

A. Nic. Do napędzenia pompy Na^+-K^+ potrzeba ATP.

B. ATP ulega hydrolizie, a Na^+ jest pompowany do pęcherzyków, budując gradient stężeń Na^+ w poprzek błony. W tym samym czasie K^+ jest wypompowywany z pęcherzyków tworząc gradient K^+ o odwrotnej polarności. Pompa zatrzyma się, gdy wszystkie jony K^+ zostaną wypompowane z pęcherzyka lub gdy zużyje się ATP.

C. Pompa Na^+-K^+ będzie przechodzić przez etapy 1, 2 i 3 podane na rys. 12-11. Ponieważ jednak wszystkie etapy reakcji muszą przebiegać ściśle sekwencyjnie, w nieobecności K^+ nie może nastąpić defosforylacja i przełączenie konformacji. Dlatego pompa Na^+-K^+ utknie w stanie ufosforylowanym, czekając bez końca na jon potasu. Ilość przetransportowanych jonów sodu będzie minimalna, ponieważ każda cząsteczka pompy będzie działała tylko jeden raz. Podobne eksperymenty, polegające na analizowaniu konsekwencji opuszczenia poszczególnych jonów, były stosowane do wyznaczenia sekwencji etapów pracy pompy Na^+-K^+.

D. ATP zostałby zhydrolizowany, a jony Na^+ i K^+ byłyby przepompowywane poprzez błonę, jak w przypadku A. Jednakże cząsteczki pompy usytuowane w błonie w odwrotnej orientacji byłyby całkowicie nieaktywne (nie będą one pompować jonów w przeciwnym kierunku — jak można by błędnie pomyśleć), ponieważ ATP nie miałby dostępu do odpowiedniej strony tych cząsteczek, aby je ufosforylować. Strona ta jest normalnie, a więc w komórce, eksponowana do cytozolu. ATP jest cząsteczką silnie naładowaną i nie może przejść przez błony bez pomocy specyficznego przenośnika.

E. ATP ulega hydrolizie, a jony Na^+ i K^+ są pompowane poprzez błonę, jak opisano to w przypadku A. Jednakże K^+ natychmiast wpływa z powrotem do pęcherzyków przez spoczynkowe kanały K^+. Jon K^+ przemieszcza się zgodnie z gradientem stężeń K^+, wytworzonym działaniem pompy Na^+-K^+. Wraz z każdym K^+, który wnika do pęcherzyka przez kanał spoczynkowy, zostaje przemieszczony poprzez błonę ładunek dodatni, wytwarzając potencjał błonowy dodatni od strony wnętrza pęcherzyka. K^+ przestanie w końcu wpływać poprzez kanały spoczynkowe z chwilą, gdy potencjał błonowy zrównoważy gradient stężeń. Opisane tu działanie jest nieco uproszczone; w rzeczywistości w komórkach ssaków pompa Na^+-K^+ usuwa z komórek 3 jony sodu na każde 2 jony potasu, które pompuje ona do komórki, umożliwiając przez to prąd elektryczny w poprzek błony i biorąc dodatkowy, mały

udział w budowaniu spoczynkowego potencjału błonowego (który w związku z tym tylko w przybliżeniu odpowiada stanowi równowagi dla K^+, przemieszczającego się przez spoczynkowe kanały K^+).

Odpowiedź 12-15. Kanały jonowe mogą być bramkowane ligandem, bramkowane napięciem lub bramkowane mechanicznie.

Odpowiedź 12-16. Komórka ma objętość 10^{-12} litra (= 10^{-15} m^3), a więc zawiera $6 \cdot 10^4$ jonów wapnia ($=6 \cdot 10^{23}$ cząsteczek/mol $\cdot 100 \cdot 10^{-9}$ mol/dm$^3 \cdot 10^{-12}$ dm^3). Aby więc zwiększyć wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} pięćdziesięciokrotnie, do komórki musi wejść dalsze 2 940 000 jonów wapnia (zwróć uwagę, że gdy stężenie wynosi 5 µM, w komórce znajduje się $3 \cdot 10^6$ jonów, z których 60 000 było już obecne przed otwarciem kanału). Ponieważ każdy z 1000 kanałów umożliwia przejście 10^6 jonów na sekundę, każdy kanał musi pozostać otwarty tylko przez 3 milisekundy.

Odpowiedź 12-17. Komórki zwierzęce jako siły napędowej używają elektrochemicznego gradientu Na^+. Do podtrzymania tego gradientu jest potrzebny ATP jako „paliwo" dla pompy Na^+-K^+.

Odpowiedź 12-18

A. Pompowanie H^+ poprzez błonę do wnętrza endosomów powoduje powstanie elektrochemicznego gradientu H^+ złożonego z potencjału elektrycznego i gradientu stężeń, przy czym wnętrze pęcherzyka ma ładunek dodatni. Oba te komponenty składają się na energię, która jest zmagazynowana w gradiencie i musi być dostarczona do jego wytworzenia. Dlatego też gradient elektrochemiczny będzie ograniczał przenoszenie dalszych jonów H^+. Gdy jednak błona zawiera również kanały Cl^-, to ujemnie naładowany Cl^- będzie wpływał do endosomów i obniżał potencjał elektryczny. Dzięki temu dalsze pompowanie H^+ poprzez błonę staje się energetycznie mniej kosztowne i wnętrze endosomów może ulec dalszemu zakwaszeniu.

B. Tak. Jak wyjaśniono w (A), pewne zakwaszenie będzie nadal zachodzić przy braku kanałów Cl^-.

Odpowiedź 12-19

A. Patrz rys. O12-19 (A).

B. Szybkość transportu związku A jest proporcjonalna do jego stężenia, co wskazuje, że związek A może dyfundować przez błony. Związkiem A jest prawdopodobnie etanol, ponieważ jako mała i względnie niepolarna cząsteczka może on łatwo dyfundować przez dwuwarstwę fosfolipidową. Natomiast szybkość transportu związku B ulega wysyceniu w dużych stężeniach, co wskazuje, że związek B jest przenoszony poprzez błonę przez białko transportujące. Szybkość transportu nie może przekroczyć szybkości maksymalnej, przy której to białko pracuje. Związkiem B jest prawdopodobnie octan, ponieważ jest on cząsteczką naładowaną, która nie może przejść przez błonę bez pomocy błonowego białka transportującego.

C. W przypadku etanolu otrzymaliśmy liniową zależność między stężeniem a szybkością transportu. Tak więc, gdy stężenie wynosi 0,5 mM, szybkość transportu będzie 10 µmol/ /min, a gdy stężenie wynosi 100 mM, szybkość transportu będzie 2 mmol/min.

Dla transportu octanu, w którym pośredniczy przenośnik białkowy, związek między stężeniem, S, a szybkością transportu może być określony równaniem Michaelisa–Menten, które opisuje proste reakcje enzymatyczne:

$$(1)\ \text{szybkość transportu} = V_{max} \cdot S/[K_M + S]$$

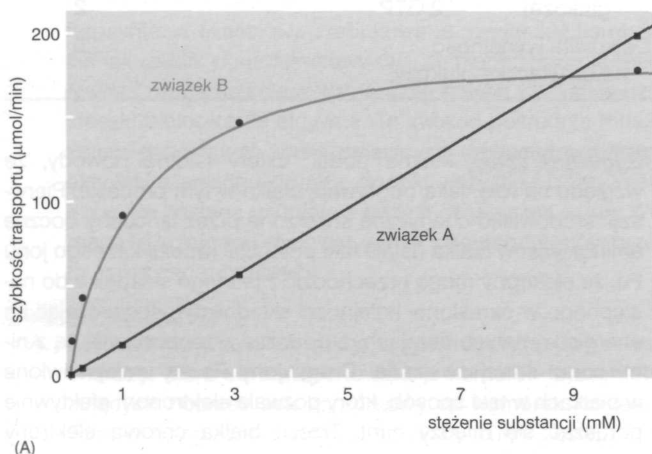
Przypomnij sobie z rozdz. 5 (patrz pytanie 5-7, s. 171), że do wyznaczenia V_{max} i K_M używa się ułatwienia, w którym równanie Michaelisa–Menten zostaje tak przekształcone, iż można uzyskane dane wykreślić jako linię prostą. W wyniku prostego przekształcenia otrzymujemy

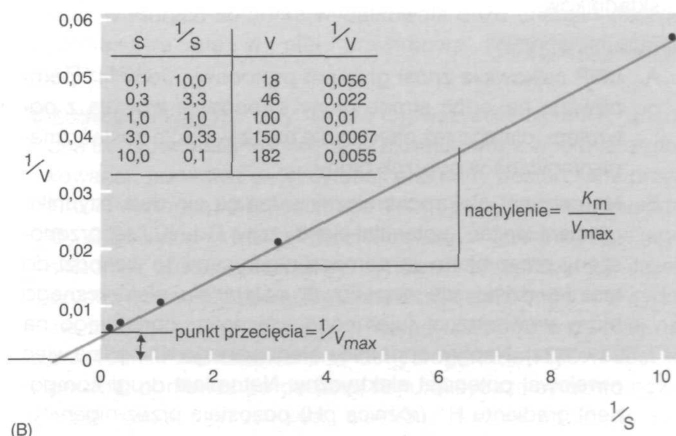
$$(2)\ \mathbf{1/szybkość} = (K_M/V_{max})\ \mathbf{(1/S)} + 1/V_{max}$$

(tj. równanie typu $\mathbf{y} = \mathbf{a}\mathbf{x} + \mathbf{b}$)

Obliczenie dla danych wartości 1/szybkość i 1/S oraz sporządzenie z nich nowego wykresu jak na rys. O12-19 (B) — daje linię prostą. Wartość K_M (=1,0 mM) i V_{max} (=200 µmol/min) odczytuje się z przecięcia krzywej z osią y ($1/V_{max}$) oraz z kąta jej nachylenia (K_M/V_{max}). Znajomość wartości K_M i V_{max} umożliwia — z użyciem równania (1) —

Rys. O12-19





obliczenie szybkości transportu, gdy stężenie octanu jest 0,5 mM i 100 mM. Wyniki wynoszą, odpowiednio, 67 μmol/min i 198 μmol/min.

Rozdział 13

Odpowiedź 13-1. DNP powodując przepuszczalność błony dla protonów niszczy, lub w bardzo małych stężeniach zmniejsza, gradient protonowy utworzony w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej. Komórka dalej utlenia cząsteczki pokarmowe, aby zasilać elektronami łańcuch transportu elektronów, natomiast wypompowane na drugą stronę błony jony H^+ przechodzą w jałowym cyklu z powrotem do mitochondriów. Ich energia nie może być wykorzystywana do napędzania syntezy ATP i dlatego uwalnia się ciepło. Pacjenci, którym podano małą dawkę DNP, tracą masę, ponieważ ich rezerwy tłuszczu są bardzo szybko zużywane do zasilania łańcucha transportu elektronów, jako że cały ten proces po prostu „marnotrawi" energię.

Podobny mechanizm wytwarzania ciepła wykorzystuje specyficzna tkanka składająca się z brunatnych komórek tłuszczowych, występująca w znacznej ilości u ludzkich noworodków i zwierząt hibernujących. W komórkach tych mitochondria są częściowo nieszczelne dla wytworzonego przez siebie gradientu H^+, a wracające z powrotem przez błonę protony powodują jedynie ogrzewanie organizmu. Komórki mają kolor brązowy, ponieważ wraz z gęstym upakowaniem mitochondriów wzrasta stężenie barwnych białek, na przykład cytochromów.

Odpowiedź 13-2. Wewnętrzna błona mitochondrialna jest miejscem fosforylacji oksydacyjnej, podczas której powstaje większość komórkowego ATP. Grzebienie są skierowanymi do wewnątrz fałdami wewnętrznej błony mitochondrialnej. Mitochondria z gęściej ułożonymi grzebieniami mają większą powierzchnię błony wewnętrznej, a zatem większą zdolność przeprowadzania fosforylacji oksydacyjnej. Mięsień sercowy w czasie trwania skurczu zużywa wiele energii, natomiast komórki skóry mają mniejsze zapotrzebowanie energetyczne. Zatem w komórce mięśnia sercowego duże zagęszczenie grzebieni mitochondrialnych zwiększa zdolność do wytwarzania ATP. Jest to znakomity przykład, jak komórki dostosowują do swoich potrzeb ilość poszczególnych składników.

Odpowiedź 13-3

A. DNP całkowicie znosi gradient protonowy. Jony H^+ pompowane na jedną stronę błony swobodnie wracają z powrotem, dlatego też energia nie może w ogóle zostać zmagazynowana w poprzek błony.

B. Na gradient elektrochemiczny składają się dwa czynniki: gradient stężeń i potencjał elektryczny. Gdy K^+ jest przenoszony przez błonę za pomocą nigerycyny, to wchodzi do matriks dzięki sile napędowej potencjału elektrycznego błony wewnętrznej (ujemnego wewnątrz, dodatniego na zewnątrz). Napływ dodatnio naładowanego K^+ będzie więc niwelował potencjał elektryczny. Natomiast drugi komponent gradientu H^+ (różnica pH) pozostaje przez nigerycynę nie zmieniony. Zatem zostaje stracona tylko część siły napędowej energetycznie korzystnej dla przepływu jonów H^+ z powrotem do matriks.

Odpowiedź 13-4

A. Taką turbiną obracającą się w przeciwnym kierunku jest napędzana elektrycznie pompa wodna, która działa analogicznie do syntazy ATP, wykorzystującej energię hydrolizy ATP do pompowania protonów wbrew ich gradientowi elektrochemicznemu tworzonemu w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej.

B. Syntaza ATP powinna przestać się obracać wtedy, gdy energia czerpana przez nią z gradientu protonowego jest dokładnie zrównoważona przez zmianę energii swobodnej potrzebną do wytwarzania ATP; w punkcie równowagi nie będzie ani syntezy, ani zużycia ATP netto.

C. Gdy komórka zużywa ATP, w matriks stosunek ATP: ADP spada poniżej opisanego punktu równowagi, a syntaza ATP wykorzystuje energię zmagazynowaną w gradiencie protonowym do syntezy ATP, aby odbudować pierwotny stosunek ATP: ADP. Odwrotnie, gdy elektrochemiczny gradient protonowy spada poniżej punktu równowagi, syntaza ATP do przywrócenia tego gradientu używa ATP z matriks.

Odpowiedź 13-5

A. Para elektronów przechodząca z NADH do O_2 przez trzy kompleksy oddechowe powoduje wypompowanie 10 H^+ na drugą stronę błony. Do wytworzenia każdej cząsteczki ATP potrzeba 4 H^+: trzy do syntezy ATP i jeden do przeniesienia ATP do cytozolu. Tak więc utlenianie każdej cząsteczki NADH pozwala na syntezę 2,5 cząsteczek ATP.

B. W wyniku działania cyklu kwasu cytrynowego z jednej cząsteczki glukozy powstaje 20 cząsteczek ATP, natomiast w wyniku całego procesu utleniania jednej cząsteczki glukozy dochodzi do syntezy 30 cząsteczek ATP.

Proces	Produkt bezpośredni	Ostateczna ilość ATP
Glikoliza	2 NADH (cytozol)	3
	2 ATP	2
Utlenianie pirogronianu	2 NADH (matriks mitochondrialna)	5
Utlenianie acetylo-CoA (dwa na glukozę)	6 NADH (matriks mitochondrialna)	15
	2 $FADH_2$	3
	2 GTP	2
Całkowita wydajność na cząsteczkę glukozy		30

Odpowiedź 13-6. Można podać cztery istotne powody, ze względu na rolę, jaką odgrywają białka w tym procesie. Pierwszy: środowisko chemiczne stworzone przez łańcuchy boczne aminokwasów białka ustala taki potencjał redoks każdego jonu Fe, że elektrony mogą przechodzić z jednego składnika do następnego w określonej kolejności składników, dostarczając im energię w małych porcjach, a podczas przechodzenia są z nimi coraz silniej związane. Drugi: jony Fe są umiejscowione w białkach w taki sposób, który pozwala elektronom efektywnie poruszać się między nimi. Trzeci: białka chronią elektrony przed omijaniem etapów pośrednich; jak już wiemy w związku

z innymi enzymami (omówionymi w rozdz. 5), kierują przepływ elektronów wzdłuż określonej drogi. Czwarty: białka sprzęgają ruch elektronów „w dół ich energetycznej drabiny” z pompowaniem protonów w poprzek błony, wskutek czego wykorzystują uwalnianą energię i magazynują ją w gradiencie protonowym, który z kolei jest używany do syntezy ATP.

Odpowiedź 13-7. Użycie tego samego przenośnika w obu miejscach nie byłoby produktywne. Na przykład, jeżeli ubichinon mógłby przenosić elektrony bezpośrednio do oksydazy cytochromowej, kompleks cytochromów b-c_1 byłby często pomijany, gdy donorem elektronów jest dehydrogenaza NADH. Przy dużej różnicy potencjału redoks istniejącej między ubichinonem a oksydazą cytochromową, duża ilość energii byłaby uwalniana w postaci ciepła, a zatem zmarnowana. Podobnie bezpośrednie przeniesienie elektronu z dehydrogenazy NADH do cytochromu c pozwalałoby na ominięcie kompleksu cytochromów b-c_1.

Odpowiedź 13-8. Protony przepompowane przez wewnętrzną błonę mitochondrium do przestrzeni międzybłonowej osiągają stężenie równe ich stężeniu w cytozolu, który funkcjonuje jako ogromny zbiornik H^+. Zarówno matriks mitochondrialna, jak i cytozol są miejscem wielu reakcji metabolicznych, które wymagają pH zbliżonego do obojętnego. Różnica stężenia H^+, ΔpH, jaka może powstać między matriks mitochondrialną a cytozolem, jest zatem relatywnie nieduża (rzędu jednej jednostki pH). Większość energii zgromadzonej w mitochondrialnym elektrochemicznym gradiencie protonowym jest obecna w formie potencjału elektrycznego błony, czyli komponentu $\Delta\psi$ (patrz rys. 13-12).

Natomiast w chloroplastach przedział, do którego są przepompowywane H^+, jest znacznie mniejszy. W efekcie może być uzyskiwana znacznie większa różnica stężeń (do tysiąca razy, czyli 3 jednostek pH) i większość energi zgromadzonej w tylakoidowym gradiencie H^+ jest wynikiem różnicy stężeń H^+ między światłem tylakoidu a stromą, czyli występuje w formie komponentu pH.

Odpowiedź 13-9. Wszystkie twierdzenia są poprawne.

A. Jest to warunek konieczny. Gdyby tak nie było, elektrony nie mogłyby być odciągane z wody i nie zachodziłaby reakcja rozkładu wody ($H_2O \rightarrow 2H^+ + {}^1/_2 O_2 + 2e^-$).

B. Transport ten pozwala wykorzystać energię fotonu do przekształceń chemicznych.

C. Można dowieść, że jest to jedna z najważniejszych przeszkód, które musiały być usunięte w toku ewolucji procesu fotosyntezy: częściowo zredukowane cząsteczki tlenu, takie jak rodnik ponadtlenkowy O_2^-, są niebezpiecznie reaktywne i mogą atakować i zniszczyć prawie wszystkie cząsteczki biologicznie aktywne. Te związki pośrednie muszą zatem pozostawać ściśle związane z metalami w miejscu aktywnym enzymu dopóty, dopóki wszystkie cztery elektrony nie zostaną usunięte z dwóch cząsteczek wody. Wymaga to kolejnego wychwytywania czterech fotonów przez to samo centrum reakcji.

Odpowiedź 13-10

A. Fotosynteza wytwarza cukry, w tym najważniejszy — sacharozę, które są transportowane z komórek fotosyntetyzujących poprzez sok komórkowy do komórek korzenia. Tam, w cytoplazmie komórki korzenia, cukry zostają utlenione w procesie glikolizy i poprzez fosforylację oksydacyjną w mitochondriach zużyte do produkcji ATP bądź — jako szkielety węglowe — do tworzenia wielu innych metabolitów.

B. Mitochondria w komórkach zawierających chloroplasty są niezbędne nawet w czasie dnia, aby dostarczyć komórce ATP pochodzący z fosforylacji oksydacyjnej. Aldehyd 3-fosfoglicerowy powstały w wyniku fotosyntezy w chloroplastach zostaje przemieszczony do cytozolu i wykorzystany ostatecznie jako źródło energii do wytwarzania ATP w mitochondriach.

Odpowiedź 13-11

A. Prawdziwa. NAD^+ i chinony są przykładami związków, które nie mają jonów metali, ale mogą brać udział w transporcie elektronów.

B. Fałszywa. Potencjał jest spowodowany przez protony (H^+), które są pompowane w poprzek błony z matriks do przestrzeni międzybłonowej. Elektrony związane z przenośnikami elektronów pozostają w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

C. Prawdziwa. Oba komponenty dają w sumie siłę napędową, która stwarza warunki korzystne energetycznie do przepływu H^+ z powrotem do matriks.

D. Prawdziwa. Oba składniki poruszają się szybko w płaszczyźnie błony.

E. Fałszywa. Mitochondria są potrzebne roślinom do syntezy ATP nie tylko w tych komórkach, które nie mają chloroplastów, jak na przykład komórki korzeni, ponieważ mitochondria wytwarzają większość ATP w każdej komórce roślinnej.

F. Prawdziwa. Fizjologiczna funkcja chlorofilu wymaga, aby absorbował on światło: natomiast to, że hem jest związkiem kolorowym, od którego pochodzi czerwony kolor krwi, jest przypadkowe.

G. Fałszywa. Chlorofil absorbuje światło i przenosi energię w formie zenergizowanego elektronu, natomiast żelazo w hemie jest prostym przenośnikiem elektronów.

H. Fałszywa. Większość suchej masy drzewa stanowi węgiel pochodzący z CO_2, związany podczas fotosyntezy.

Odpowiedź 13-12. Przepływają trzy protony. Dokładna wartość ΔG dla syntezy ATP zależy od stężenia ATP, ADP i P_i (jak opisano w rozdz. 3). Im wyższa jest wartość stosunku ATP do ADP, tym większa ilość energii zostaje użyta do syntezy dalszego ATP. Tak więc mniejsza wartość, 46 kJ/mol, dotyczy warunków, w których komórka wydatkowała dużo energii i dlatego zmniejszyła się w niej prawidłowa wartość stosunku ATP : ADP.

Odpowiedź 13-13. Gdy nie ma O_2, wszystkie składniki łańcucha transportu elektronów będą akumulowane w formie *zredukowanej*, ponieważ w tej sytuacji elektrony dostarczane przez NADH wchodzą na łańcuch, ale nie mogą być przeniesione do O_2. Stąd łańcuch transportu elektronów, w tym wszystkie jego składniki, zostaje „utrwalony” w formie zredukowanej. Jeżeli szybko zostanie podany O_2, przenośniki elektronów w oksydazie cytochromowej przejdą w formę *utlenioną* wcześniej niż przenośniki zlokalizowane w dehydrogenazie NADH. Jest to prawda, ponieważ po dodaniu tlenu oksydaza cytochromowa odda swoje „zatrzymane” elektrony bezpośrednio do O_2, wskutek czego zostanie utleniona. Fala zwiększającego się

utleniania przechodzi — z opóźnieniem — w kierunku odwrotnym, tj. cofa się od oksydazy cytochromowej przez poszczególne składniki łańcucha transportu elektronów, w miarę jak każdy z tych składników odzyskuje możliwość przeniesienia swoich elektronów do składników łańcucha w kierunku zgodnym ze spadkiem potencjału redoks.

Odpowiedź 13-14. Wyjątkowo duża liczba protonów będzie przepływać do matriks wytwarzając ATP bardzo szybko — aż do momentu osiągnięcia równowagi, to jest do momentu, kiedy przepływ protonów jest tak duży, że ilość energii będącej do dyspozycji w gradiencie protonowym zmniejsza się do ilości energii potrzebnej do tworzenia ATP. Przy mniejszej wartości stosunku ATP:ADP, do syntezy ATP jest potrzebna mniejsza wartość ΔG. Dlatego w komórkach, w których wartość stosunku ATP:ADP jest mała, gradient protonowy będzie malał aż do ustalenia się nowego niskiego poziomu.

Odpowiedź 13-15. Utleniony ubichinon przyjmuje podczas redukcji nie tylko dwa elektrony, ale także dwa protony pobrane z wody (rys. 13-20). Po utlenieniu protony te zostaną uwolnione. Gdy redukcja zachodzi po jednej stronie błony, a utlenianie po drugiej stronie, na każdy transportowany elektron zostaje wypompowany w poprzek błony proton. Zatem transport elektronów przez ubichinon bierze bezpośredni udział w powstawaniu gradientu H^+.

Odpowiedź 13-16. Fotosyntetyzujące bakterie i komórki roślinne wykorzystują elektrony pochodzące z reakcji $2\,H_2O \rightarrow 4e^- + 4\,H^+ + O_2$ do redukcji $NADP^+$ w NADPH, który z kolei jest zużywany w syntezie niezbędnych metabolitów. Gdyby elektrony obok wytwarzania O_2 zostały użyte również do redukowania $2H^+$ w H_2, komórki utraciłyby jakiekolwiek korzyści płynące z przeprowadzania takiej reakcji, ponieważ elektrony nie mogłyby zostać wykorzystane do reakcji użytecznych metabolicznie.

Odpowiedź 13-17

A. Kolejne umieszczenie w roztworach o różnym pH tworzy gradient pH w poprzek błony tylakoidu. Przepływ jonów H^+ zgodnie z ich elektrochemicznym potencjałem stanowi siłę napędową syntazy ATP, która przekształca ADP w ATP.

B. Światło nie jest potrzebne, ponieważ gradient H^+ został utworzony sztucznie bez udziału zależnego od światła łańcucha transportu elektronów.

C. Nic. Gradient H^+ zostanie utworzony w niewłaściwym kierunku; syntaza ATP nie będzie pracowała.

D. Doświadczenie potwierdziło prawdziwość modelu chemiosmotycznego przez wykazanie, że gradient H^+ jest wystarczającą siłą napędową do syntezy ATP.

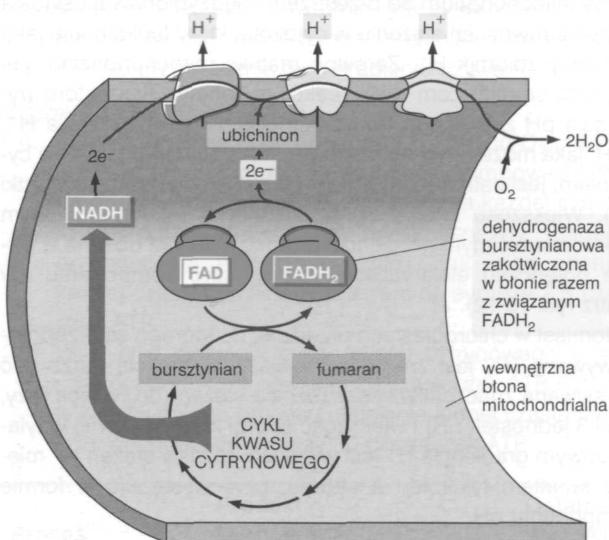
Odpowiedź 13-18

A. Gdy pęcherzyki są wystawione na działanie światła, jony H^+ (pobierane z wody) pompowane do pęcherzyków przez bakteriorodopsynę przepływają z powrotem przez syntazę ATP, powodując jako reakcję na światło wytwarzanie ATP w roztworze stanowiącym środowisko pęcherzyków.

B. Jeżeli pęcherzyki są nieszczelne, gradient H^+ nie powstaje i w konsekwencji syntaza ATP nie może działać.

C. Posługiwanie się składnikami ze skrajnie odległych gatunków organizmów może stanowić bardzo skuteczne narzędzie doświadczalne. Ponieważ te dwa białka pochodzą z tak różniących się źródeł, to najprawdopodobniej nie oddziałują one na siebie bezpośrednio. Dlatego doświadczenie to silnie sugeruje, że transport elektronów i synteza ATP są oddzielnymi procesami. Stąd to podejście do doświadczenia jest uzasadnione.

Odpowiedź 13-19. Potencjał redoks $FADH_2$ jest zbyt mały, aby elektrony mogły być przeniesione do kompleksu dehydrogenazy NADH, ale wystarczająco duży do przeniesienia elektronów na ubichinon (rys. 13-21). Dlatego elektrony z $FADH_2$ mogą wejść na łańcuch transportu elektronów tylko na tym etapie (rys. O13-19). Ponieważ kompleks dehydrogenazy NADH jest pominięty, mniej jonów H^+ zostaje wypompowywanych poprzez błonę i powstaje mniej ATP. Ten przykład pokazuje wszechstronność łańcucha transportu elektronów. Uważa się, że zdolność do wykorzystania bardzo różnych źródeł elektronów ze środowiska, aby zasilić transport elektronów, jest cechą niezbędną, która pojawiła się wcześnie w toku ewolucji życia.



Rys. O13-19

Odpowiedź 13-20. Gdyby te bakterie do syntezy ATP używały gradientu protonowego w sposób analogiczny do innych bakterii (to znaczy mniej protonów wewnątrz niż na zewnątrz), to musiałyby zwiększyć swoje pH powyżej pH środowiska (pH 10) komórki. Z cytoplazmą o pH większym niż 10 byłyby niezdolne do życia. Dlatego te bakterie do chemiosmotycznego sprzężenia transportu elektronów z syntazą ATP muszą korzystać z gradientu innych jonów niż H^+, na przykład gradientu Na^+.

Odpowiedź 13-21. Wypowiedzi A i B są prawdziwe. Wypowiedź C jest niewłaściwa, ponieważ w każdym z tych cykli zachodzą zupełnie inne reakcje, mimo że efekt netto jest taki sam jak ten, którego można by oczekiwać w przypadku zwykłego odwrócenia cyklu.

Odpowiedź 13-22. To doświadczenie sugerowałoby model dwuetapowego funkcjonowania syntazy ATP. Zgodnie z tym modelem przepływ protonów przez podstawę syntazy napędza rotację główki, która to rotacja z kolei powoduje syntezę ATP. Autorom udało się w ich doświadczeniu rozdzielić te dwa etapy. Jeżeli w nieobecności gradientu protonowego mechaniczne po-

wodowanie rotacji główki wystarcza do wytwarzania ATP, to syntaza ATP jest urządzeniem białkowym, które naprawdę funkcjonuje tak jak „turbina molekularna". Byłoby to rzeczywiście doświadczenie bardzo ekscytujące, ponieważ wykazałoby w sposób bezpośredni związek między ruchem mechanicznym a aktywnością enzymatyczną. Nie ma wątpliwości, że doświadczenie to powinno być opublikowane i że stanie się „klasyczne".

Odpowiedź 13-23. Jedynie w warunkach podanych w układzie (E) obserwuje się przejście elektronu do cytochromu *c* i odpowiednią jego redukcję. W tej mieszaninie zrekonstytuowano fragment łańcucha transportu elektronów, tak iż elektrony mogą płynąć w energetycznie korzystnym kierunku ze zredukowanego ubichinonu przez kompleks b-c_1 do cytochromu *c*. Aczkolwiek energetycznie korzystne, takie przejście nie może zajść spontanicznie w układzie (A) ze względu na brak kompleksu b-c_1, niezbędnego do katalizowania tej reakcji. W pozostałych doświadczeniach przepływ elektronów nie zachodzi niezależnie od tego, czy kompleks b-c_1 jest obecny, czy nie; w doświadczeniach (B) i (F) zarówno ubichinon, jak i cytochrom *c* są utlenione; w doświadczeniach (C) i (G) oba są zredukowane, a w doświadczeniach (D) i (H) przepływ elektronów jest energetycznie niekorzystny, ponieważ zredukowany cytochrom zawiera mniej energii swobodnej niż utleniony ubichinon.

Rozdział 14

Odpowiedź 14-1. Aczkolwiek otoczka jądrowa tworzy jedną ciągłą błonę, ma obszary wyspecjalizowane o charakterystycznym wyglądzie i składzie białkowym. Jednym z takich obszarów jest wewnętrzna błona jądrowa. Białka błonowe mogą rzeczywiście dyfundować pomiędzy wewnętrzną i zewnętrzną błoną jądrową w ich złączeniach istniejących wokół porów jądrowych. Jednakże białka pełniące specjalne funkcje w błonie wewnętrznej są w niej zazwyczaj zakotwiczone przez interakcję z innymi składnikami, takimi jak chromosomy i blaszka jądrowa; ta ostatnia jest siateczką białek wyścielającą wewnętrzną błonę jądrową od strony matriks i pomaga utrzymać strukturalną integralność otoczki jądrowej.

Odpowiedź 14-2. Ekspresja genów eukariotycznych jest bardziej skomplikowana niż ekspresja genów prokariotycznych. W szczególności komórki prokariotyczne nie mają intronów, przerywających kodujące sekwencje ich genów, dzięki czemu mRNA może ulegać translacji bezpośrednio po swojej transkrypcji, bez potrzeby dalszego dojrzewania (co omówiono w rozdz. 7). Dlatego też w komórkach prokariotycznych translacja mRNA na rybosomach zaczyna się jeszcze przed ukończeniem transkrypcji. W komórkach eukariotycznych miałoby to tragiczne konsekwencje, ponieważ większość transkryptów RNA musi być poddana splicingowi, zanim może ulec translacji. Otoczka jądrowa oddziela procesy transkrypcji i translacji zarówno przestrzennie, jak i czasowo. Pierwotny transkrypt RNA jest zatrzymywany w jądrze, dopóki nie przejdzie w dojrzały mRNA i dopiero wtedy wolno mu opuścić jądro tak, aby rybosomy mogły przeprowadzić jego translację.

Odpowiedź 14-3. Cząsteczka mRNA jest złączona z błoną ER poprzez rybosomy dokonujące translacji tej cząsteczki. Jednakże ta populacja rybosomów nie jest statyczna; mRNA jest ustawicznie przesuwany przez rybosom. Rybosomy, które ukończyły translację, oddysocjowują z końca 3′ mRNA i od błony ER, ale sam mRNA pozostaje związany przez inne rybosomy świeżo doprowadzone z puli cytozolowej, które dołączają do końca 5′ mRNA i kontynuują jego translację. Zależnie od jej długości, do każdej cząsteczki związanego z błoną mRNA przyłączonych jest ok. 10–20 rybosomów.

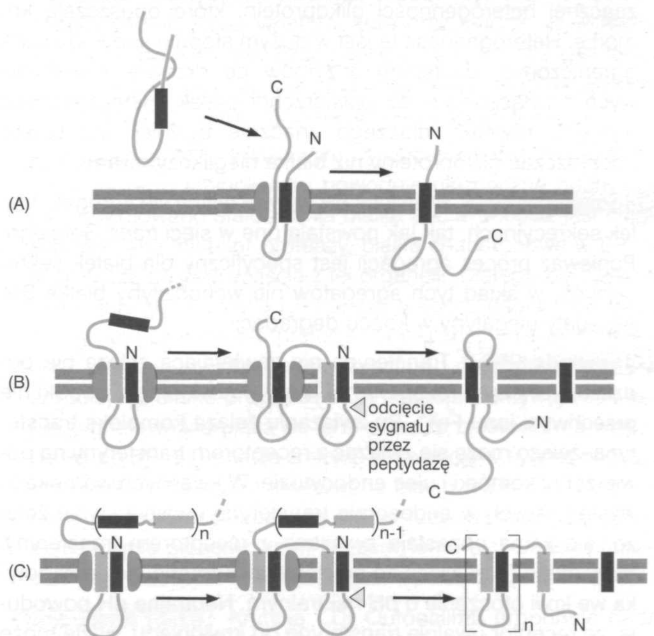
Odpowiedź 14-4

A. Wewnętrzna sekwencja sygnałowa działa jako zakotwiczenie w błonie, jak pokazano na rys. 14-15. Ponieważ jednak brakuje sekwencji stop-transfer, karboksylowy koniec białka ulegnie całkowitej translokacji do światła ER. Dlatego też domena przy końcu N powstałego białka zwrócona będzie do cytozolu, a pojedynczy segment transbłonowy połączy ją z domeną przy końcu C, wystawioną do światła ER (rys. O14-4A).

B. Sekwencja sygnałowa przy końcu N białka rozpoczyna translokację domeny przy tym końcu, dopóki sekwencja stop-transfer nie zatrzyma translokacji. Domena cytozolowa jest w dalszym ciągu syntetyzowana, dopóki sekwencja rozpoczęcia translokacji nie zainicjuje translokacji powtórnie. Obecna sytuacja przypomina tę opisaną w (A), a domena przy końcu C białka zostaje przeniesiona do światła ER. Dlatego też powstałe białko ma dwa odcinki transbłonowe. Zarówno domena przy końcu N, jak i domena przy końcu C znajdują się w świetle ER, a tylko pętla pomiędzy dwoma segmentami transbłonowymi jest skierowana do cytozolu (rys. O14-4B).

C. Konieczne byłoby następujące ustawienie sekwencji: odcinana sekwencja sygnałowa, po niej wewnętrzna sekwencja stop-transfer, a następnie kolejne pary sekwencji rozpoczynających i kończących translokację (rys. O14-4C).

Przykłady te pokazują, że złożone motywy topologii białka można uzyskać przez warianty i kombinacje dwóch podstawowych mechanizmów przedstawionych na rys. 14-15 i 14-16.



Rys. O14-4

Odpowiedź 14-5

A. Płaszcz klatrynowy nie może się wytworzyć w nieobecności adaptyn, które wiążą klatrynę z błoną. Wprawdzie gdy stężenie klatryny jest duże i istnieją odpowiednie warunki jonowe, tworzą się w roztworze klatki klatrynowe, ale są one pustymi skorupami, które nie zawierają ani białek, ani błony. Wskazuje to, że informacja do utworzenia klatki klatrynowej jest zawarta w samych cząsteczkach klatryny, które są zdolne do samoorganizacji.

B. Bez klatryny, adaptyny nadal wiążą receptory znajdujące się w błonie, ale płaszcz klatrynowy nie może powstać, przez co nie wytworzą się ani dołki, ani pęcherzyki opłaszczone klatryną.

C. W błonie tworzą się głęboko wpuklone dołki opłaszczone klatryną, ale nie mogą się one oderwać i utworzyć zamkniętych pęcherzyków.

D. Komórki prokariotyczne nie prowadzą endocytozy i ich błona nie zawiera żadnych receptorów, które miałyby odpowiednie domeny cytozolowe zdolne do związania adaptyn. Dlatego też klatryna nie może ulec związaniu i nie może powstać płaszcz klatrynowy.

Odpowiedź 14-6. Złożony wstępnie kompleks cukrów pozwala na lepszą kontrolę jakości. Poprawność złożenia łańcuchów oligosacharydowych może być łatwo sprawdzona przed dołączeniem ich do białka; jeśli błąd nastąpiłby przy pojedynczym dodawaniu cukrów, całe białko byłoby stracone. Strategia ta jest bardziej ekonomiczna, ponieważ dużo więcej energii potrzeba do zbudowania białka, niż do zbudowania krótkiego łańcucha oligosacharydowego. Poza tym skoro drzewko cukrowcowe zostanie już dodane do białka, trudniej jest enzymom modyfikować jego odgałęzienia, niż prowadzić te modyfikacje na wolnym drzewku cukrowcowym. Trudność ta staje się widoczna w miarę jak białko przesuwa się ku powierzchni komórki. Aczkolwiek łańcuchy cukrowe są ustawicznie modyfikowane przez enzymy w różnych przedziałach drogi sekrecyjnej, modyfikacje te są często niekompletne i prowadzą do znacznej heterogenności glikoprotein, które opuszczają komórkę. Heterogenność ta jest w dużym stopniu spowodowana ograniczonym dostępem enzymów do drzewek cukrowcowych przyłączonych do powierzchni białek. Heterogenność wyjaśnia również, dlaczego znacznie trudniej jest badać i oczyszczać glikoproteiny niż białka nieglikozylowane.

Odpowiedź 14-7. W świetle ER wytworzyłyby się agregaty białek sekrecyjnych, tak jak powstają one w sieci *trans* Golgiego. Ponieważ proces agregacji jest specyficzny dla białek sekrecyjnych, w skład tych agregatów nie wchodziłyby białka ER. Agregaty ulegałyby w końcu degradacji.

Odpowiedź 14-8. Transferyna nie zawierająca żelaza nie oddziałuje ze swym receptorem i krąży w krwiobiegu, dopóki nie przechwyci jonu Fe^{2+}. Po związaniu żelaza kompleks transferyna–żelazo może się związać z receptorem transferyny na powierzchni komórki i ulec endocytozie. W kwaśnych warunkach występujących w endosomie transferyna uwalnia swoje żelazo, ale sama pozostaje związana z receptorem transferyny, który ulega recyklizacji do powierzchni komórki, gdzie napotyka we krwi otoczenie o pH neutralnym. Neutralne pH powoduje, że receptor uwalnia transferynę do krwiobiegu, gdzie może ona pobrać inny jon żelaza i tak powtórzyć cały cykl. Żelazo uwolnione w endosomie (podobnie jak LDL na rys. 14-29) przechodzi do lizosomów, z których zostaje przeniesione do cytozolu.

System taki umożliwia komórce bardzo wydajne pobieranie żelaza, nawet jeżeli stężenie tego metalu we krwi jest niezwykle małe. Żelazo związane z transferyną zostaje zagęszczone na powierzchni komórki przez przyłączenie do receptora transferyny. Jest ono dalej zagęszczane w dołkach opłaszczonych klatryną, które gromadzą receptory transferyny. W ten sposób transferyna krąży między krwią i endosomami dostarczając żelazo niezbędne do wzrostu komórki.

Odpowiedź 14-9

A. Poprawne.

B. Niepoprawne. Sekwencje sygnałowe kierujące białka do ER zawierają rdzeń złożony z ośmiu lub więcej aminokwasów hydrofobowych. Pokazana tu sekwencja zawiera wiele hydrofilowych reszt aminokwasowych, w tym aminokwasy naładowane — His, Arg, Asp i Lys — oraz nie naładowane — Gln i Ser.

C. Poprawne. W przeciwnym przypadku nie mogłyby się przyłączyć do właściwej błony docelowej ani ściągnąć elementów kompleksu fuzyjnego do miejsca swego zakotwiczenia.

D. Poprawne.

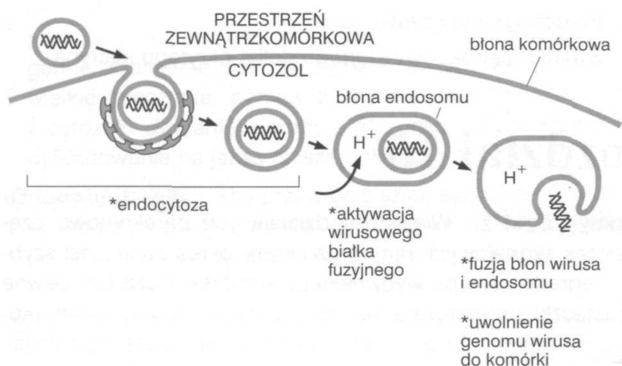
E. Poprawne. Białka lizosomowe zostają wyselekcjonowane w sieci *trans* Golgiego i upakowane w pęcherzyki transportujące, przenoszące je do późnego endosomu. Bez takiej selekcji uniemożliwionej brakiem poprawnego adresu, wniknęłyby one do pęcherzyków transportujących, przesuwających się konstytutywnie do powierzchni komórki.

F. Niepoprawne. Przez autofagocytozę lizosomy trawią również organelle wewnątrzkomórkowe.

G. Niepoprawne. Mitochondria nie biorą udziału w transporcie pęcherzykowym i dlatego glikoproteiny o wiązaniu *N*-glikozydowym, które są tworzone wyłącznie w ER, nie mogą być transportowane do mitochondriów.

Odpowiedź 14-10. Muszą one zawierać również sygnał kierujący do jądra. Białka mające sygnał eksportu z jądra wędrują pomiędzy jądrem a cytozolem. Przykładem jest białko A1, które wiąże się w jądrze z mRNA i wyprowadza go przez pory jądrowe. Skoro białko znajdzie się w cytozolu, jego sygnał kierujący do jądra zapewnia, że białko A1 ulega znów importowi i może kontynuować udział w eksporcie dalszych cząsteczek mRNA.

Odpowiedź 14-11. Wirus grypy wnika do komórek przez endocytozę i dociera do endosomów, gdzie napotyka kwaśne pH, które aktywuje jego białko fuzyjne. Następnie błona wirusa ulega fuzji z błoną endosomu, uwalniając do cytozolu genom wirusa (rys. O14-11). NH_3 jest drobną cząsteczką, łatwo przechodzącą przez błony; może więc wniknąć dyfuzyjnie do wszystkich przedziałów komórkowych, w tym do endosomów. Skoro znajdzie się w przedziale o kwaśnym pH, NH_3 wiąże H^+ tworząc NH_4^+, a więc naładowany jon, który nie może przejść przez błonę na zasadzie dyfuzji. W konsekwencji jony NH_4^+ akumulują się w przedziałach kwaśnych, podwyższając ich pH. Po podwyższeniu pH w endosomie wirusy nadal ulegają endocytozie, ale ponieważ ich białko fuzyjne nie może zostać zaktywowane, wirusy nie mogą wejść do cytozolu. Pamiętaj o tym następnym razem, gdy nabawisz się grypy i masz dostęp do stajni.



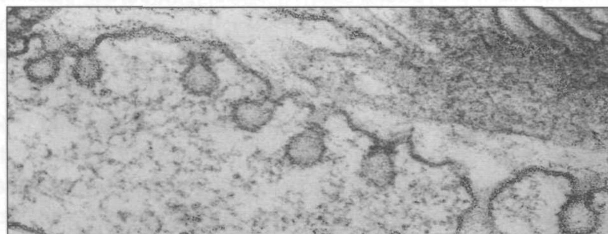
Rys. O14-11

Odpowiedź 14-12

A. Problemem jest to, że pęcherzyki, które mają w swych błonach dwa różne rodzaje białek v-SNARE mogą się łączyć z każdą z dwóch różnych błon.

B. Dotąd nie znamy odpowiedzi na tę zagadkę, ale możemy przewidzieć, że komórka musi mieć sposoby na włączanie i wyłączanie kotwiczących zdolności białek SNARE. Być może biorą w tym udział inne białka, które mogłyby być w ER pakowane razem z białkami SNARE do pęcherzyków transportujących i mogłyby ułatwiać oddziaływanie właściwego v-SNARE z tym t-SNARE, który jest obecny w sieci *cis* Golgiego.

Odpowiedź 14-13. Przekazanie sygnałów synapsie obejmuje uwolnienie przekaźnika nerwowego przez egzocytozę. W procesie tym błona pęcherzyków synaptycznych ulega fuzji z presynaptycznym segmentem błony komórkowej. Do wytworzenia nowych pęcherzyków synaptycznych błona musi zostać odzyskana z błony komórkowej w drodze endocytozy i ten właśnie etap jest zablokowany przez uszkodzoną dynaminę, ponieważ białko to jest potrzebne do oderwania powstających w endocytozie pęcherzyków okrytych klatryną. Kluczem do odkrycia tej roli dynaminy były właśnie mikrografie elektronowe synaps mutanta muszki (rys. O14-13). Zwróć uwagę na liczne butelkowate inwaginacje błony komórkowej reprezentujące głęboko wpuklone dołki okryte klatryną, które nie mogą się oderwać. Pierścienie widoczne wokół szyjek tych wpukleń są zbudowane właśnie ze zmutowanej dynaminy.



Dzięki uprzejmości: Kazuo Ikeda

Rys. O14-13

Odpowiedź 14-14. Pierwsze dwa zdania są poprawne, ale trzecie nie i powinno brzmieć: „Ponieważ zawartość światła ER ani żadnego innego przedziału dróg sekrecji czy też pinocytozy nigdy nie miesza się z cytozolem, białka, które wnikną do tych dróg, nie muszą być już nigdy importowane ponownie". Gdy podczas mitozy rozpada się otoczka jądrowa i ER, powstają z nich pęcherzyki, których zawartość jest nadal oddzielona od cytozolu przez błonę pęcherzyków.

Odpowiedź 14-15. Białko zostaje przemieszczone do ER. Jego sekwencja sygnałowa kierująca do ER zostaje rozpoznana, gdy tylko wyłoni się z rybosomu. Następnie rybosom zostaje związany z błoną ER, a rosnący łańcuch polipeptydowy jest przemieszczany przez kanał translokacyjny ER. Dlatego też sekwencja kierująca do jądra nie jest nigdy eksponowana do cytozolu. Nigdy też nie spotka receptorów importu jądrowego i białko nie wejdzie do jądra.

Odpowiedź 14-16. 1. Białka są importowane do jądra po tym, jak zostały zsyntetyzowane, sfałdowane i jeśli trzeba — złożone w kompleksy. Natomiast do ER ulegają translokacji niesfałdowane łańcuchy polipeptydowe w czasie ich tworzenia na rybosomach. Rybosomy są składane w jądrze, ale funkcjonują w cytozolu, tymczasem kompleksy enzymatyczne katalizujące transkrypcję RNA i jego splicing są składane w cytozolu, a działają w jądrze. Tak więc zarówno te kompleksy enzymatyczne, jak i rybosomy muszą być w całości transportowane przez pory jądrowe. 2. Pory jądrowe są bramkami, zawsze otwartymi dla małych cząsteczek; natomiast kanały translokacyjne w błonie ER są zwykle zamknięte, a otwierają się tylko wtedy, gdy rybosom przyłączy się do błony i kanał translokacyjny zostanie wypełniony łańcuchem polipeptydowym wchodzącym od strony cytozolu. Jest rzeczą istotną, aby błona ER pozostała podczas translokacji nieprzepuszczalna dla małych cząsteczek, ponieważ ER jest głównym magazynem Ca^{2+} w komórce, a uwolnienie tego jonu do cytozolu musi być ściśle kontrolowane (co omówiono w rozdz. 15). 3. Sygnały kierujące do jądra nie są odcinane po wejściu białka do jądra; przeciwnie, peptydy sygnałowe kierujące do ER zazwyczaj są odcinane. Sygnały kierujące do jądra są używane wielokrotnie do ponownego wprowadzenia do jądra białek, które zostały uwolnione do cytozolu podczas mitozy, kiedy to rozpada się otoczka jądrowa.

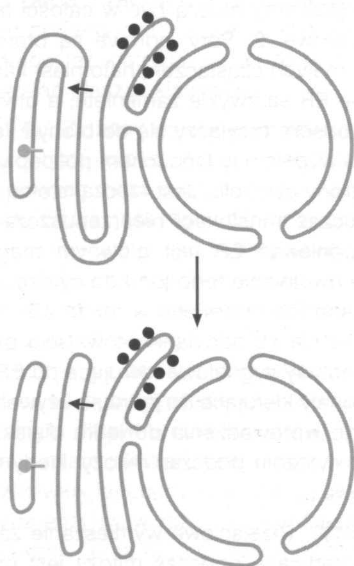
Odpowiedź 14-17. Przejściowe wymieszanie zawartości jądra i cytozolu następujące podczas mitozy jest poparciem koncepcji, według której wnętrze jądra oraz cytozol są w istocie pokrewne ewolucyjnie. Rzeczywiście, jądro można uważać za podprzedział cytozolu, który został osłonięty otoczką jądrową, a do którego dostęp umożliwiają tylko pory jądrowe.

Odpowiedź 14-18. Właściwym wyjaśnieniem jest to, że zmiana pojedynczego aminokwasu powoduje nieznaczne odchylenie od prawidłowego sfałdowania białka tak, iż chociaż jest ciągle aktywne jako inhibitor proteazy, białka chaperonowe w ER nie dopuszczą do jego wyjścia z tej organelli. Dlatego też białko to akumuluje się w świetle ER i ulega w końcu degradacji. Możliwe byłyby też inne interpretacje: 1) mutacja wpływa na stabilność białka w krwiobiegu tak, iż jest ono degradowane w krwi szybciej niż białko prawidłowe; 2) mutacja inaktywuje sekwencję sygnałową kierującą do ER i przez to uniemożliwia wejście białka do ER; 3) mutacja zmienia sekwencję w sygnał pozostania w ER, co zatrzyma zmutowane białko w ER. Do rozróżnienia tych możliwości można by się posłużyć oznakowanymi fluorescencyjnie przeciwciałami przeciw temu białku, aby prześledzić jego transport w komórce (patrz panel 5-3, s. 158–159).

Odpowiedź 14-19. Krytyka: „Dr Outonalimb proponuje badania nad biosyntezą forgetyny, bardzo interesującego białka. Jednakże podstawowa hipoteza, na której opiera ona swój

projekt, wymaga rozbudowania. W szczególności można by zakwestionować, czy forgetyna jest rzeczywiście, jak się proponuje, białkiem sekrecyjnym. Sekwencje sygnałowe kierujące do ER występują prawidłowo przy końcu N białka. Hydrofobowa sekwencja przy końcu C białka będzie eksponowana poza rybosom dopiero po zakończeniu syntezy białka i dlatego nie będzie rozpoznana przez SRP, co umożliwiłoby translokację. Dlatego jest mało prawdopodobne, aby forgetyna uległa translokacji dzięki mechanizmowi zależnemu od SRP i może ona pozostać w cytozolu. Dr Outonalimb powinna wziąć to pod uwagę, składając poprawiony wniosek o grant".

Odpowiedź 14-20. Aparat Golgiego mógł powstać z wyspecjalizowanych płatów błony ER. Takie obszary ER mogły się oderwać tworząc nowy przedział (rys. O14-20), nadal kontaktujący się z ER poprzez transport pęcherzykowy. Aby nowo powstały przedział Golgiego był użyteczny, musiały również powstać pęcherzyki transportujące.



Rys. O14-20

Odpowiedź 14-21. Jest to pytanie typu „jajo czy kura". Tak naprawdę to sytuacja taka nigdy nie pojawia się w komórkach istniejących dziś, aczkolwiek musiała stanowić poważny problem dla pierwszych powstających komórek. Nowe błony komórki powstają przez ekspansję błon już istniejących, a ER nigdy nie powstaje na nowo. Zawsze znajdzie się już istniejący fragment ER z kanałami translokacyjnymi, który umożliwi integrację nowych kanałów. Dziedziczenie nie jest więc ograniczone do namnażania się genomu; również organelle komórki muszą przechodzić z pokolenia do pokolenia. W rzeczywistości kanały translokacyjne ER można by idąc wstecz wyprowadzić z kanałów translokacyjnych występujących w prokariotycznej błonie komórkowej.

Odpowiedź 14-22

A. Przestrzeń zewnątrzkomórkowa
B. Cytozol
C. Błona komórkowa
D. Płaszcz klatrynowy
E. Błona silnie wpuklonego dołka okrytego klatryną
F. Przechwycone cząstki cargo
G. Światło głęboko wpuklonego dołka okrytego klatryną

Rozdział 15

Odpowiedź 15-1. Większość działających parakrynowo cząsteczek sygnałowych ma bardzo krótki okres życia i jest szybko degradowana po wydzieleniu z komórek. Poza tym pewne cząsteczki przyczepiają się do substancji zewnątrzkomórkowej, co uniemożliwia im dyfundowanie na dalsze odległości. Wreszcie cząsteczki bywają wydzielane do określonej przestrzeni, takiej jak szczelina synaptyczna między komórką nerwową a mięśniową, z której to przestrzeni dalsza dyfuzja do otoczenia jest znacznie ograniczona.

Odpowiedź 15-2. Każdy foton powoduje hydrolizę 80 000 cząsteczek cyklicznego GMP, co oznacza, że sygnał jest zamplifikowany 80 000 razy (= $200 \cdot 4000 \cdot 0{,}1$).

Odpowiedź 15-3. Grupy polarne są hydrofilowe, a cholesterol mający tylko jedną grupę —OH jest zbyt hydrofobowy, aby stać się skutecznym hormonem. Taki lipid, w zasadzie nierozpuszczalny w wodzie, nie mógłby się łatwo przemieszczać z jednej komórki do drugiej poprzez płyn zewnątrzkomórkowy.

Odpowiedź 15-4. W przypadku receptora steroidów aktywacja transkrypcji DNA następuje przez prosty kompleks jednej cząsteczki steroidu z jedną cząsteczką receptora; nie ma więc żadnej amplifikacji między związaniem liganda a aktywacją transkrypcji. Amplifikacja następuje później, ponieważ transkrypcja danego genu prowadzi do powstania wielu cząsteczek mRNA, z których każda ulega translacji, wytwarzając wiele cząsteczek białka (co omówiono w rozdz. 7). W przypadku receptorów jonotropowych pojedynczy kanał jonowy przepuści w czasie swego otwarcia tysiące jonów; można to uznać za amplifikacyjny etap w tym typie systemu sygnalizacji.

Odpowiedź 15-5. Zmutowane białko G byłoby prawie stale aktywne, ponieważ GDP dysocjowałby spontanicznie, umożliwiając wiązanie się GTP nawet w nieobecności uaktywnionego receptora metabotropowego. Konsekwencje dla komórki byłyby więc podobne do efektów działania toksyny cholery, która modyfikuje podjednostkę α w taki sposób, że nie może ona zhydrolizować GTP w celu jego odrzucenia. Natomiast, odmiennie niż w przypadku toksyny cholery, zmutowane białko G nie byłoby zaktywowane bez przerwy; wyłączałoby się normalnie, ale natychmiast potem byłoby reaktywowane — w miarę oddysocjowania GDP i wiązania GTP.

Odpowiedź 15-6. Szybki rozpad umożliwia utrzymanie w komórce niskiego poziomu cyklicznego AMP. Im niższy jest ten poziom, tym większy jest jego względny wzrost wywołany aktywacją cyklazy adenylanowej, wytwarzającej nowy, cykliczny AMP. Jeśli mamy w banku 100 zł i deponujemy następne 100 zł, *podwajamy nasz stan posiadania; jeśli jednak zaczynamy* od 10 zł i deponujemy 100 zł, podwyższamy nasz stan posiadania jedenastokrotnie, a więc przy tym samym depozycie uzyskujemy znacznie wyższy wzrost proporcjonalny.

Odpowiedź 15-7. Należy przypomnieć, że błona komórkowa zajmuje raczej małą powierzchnię w porównaniu z całkowitą powierzchnią wszystkich błon w komórce (co omówiono w rozdz. 14). Powierzchnia retikulum endoplazmatycznego

jest zazwyczaj w komórce znacznie większa i tworzy w niej rozgałęzioną sieć błonowych warstw i rurek. Umożliwia to homogenne uwalnianie Ca^{2+} do cytozolu w całej komórce, co ma wielkie znaczenie, ponieważ szybkie usuwanie jonów Ca^{2+} z cytozolu działaniem pomp Ca^{2+} uniemożliwia jonom Ca^{2+} dyfundowanie na jakąś dalszą odległość w cytozolu.

Odpowiedź 15-8. Aby przywrócić szlak sygnalizacyjny do stanu spoczynkowego, trzeba wyłączyć każdą reakcję biorącą udział w schemacie amplifikacji, przy czym każdy z działających tu wyłączników jest równie ważny.

Odpowiedź 15-9. Ponieważ każde przeciwciało ma dwa miejsca wiążące antygen, związanie przeciwciał z receptorem może powodować skupianie się receptorów w wielu miejscach na powierzchni komórki. Może to z dużym prawdopodobieństwem aktywować receptorowe kinazy tyrozynowe, które są aktywowane przez samofosforylację, gdy tylko indywidualne kinazowe domeny receptorów znajdą się ze sobą w sąsiedztwie. Aktywacja receptorów metabotropowych jest bardziej skomplikowana, ponieważ ligand ma na celu wywołanie szczególnej zmiany konformacji. Tylko bardzo specjalne przeciwciała naśladują ligandy receptora na tyle wiernie, że mogą wywołać zmianę konformacyjną aktywującą receptor.

Odpowiedź 15-10

A. Prawdziwe. Na przykład acetylocholina spowalnia rytm skurczu komórek mięśnia sercowego przez wiązanie się z *receptorem metabotropowym, a stymuluje skurcz komórek* mięśni szkieletowych przez wiązanie się z odmiennym receptorem acetylocholiny, który jest kanałem jonowym, bramkowanym ligandem (receptorem jonotropowym).

B. Nieprawdziwe. Acetylocholina ma krótki okres życia i swój wpływ wywiera lokalnie. W istocie, konsekwencje przedłużenia czasu jej trwania są katastrofalne. Związki hamujące enzym esterazę acetylocholinową, który rozkłada acetylocholinę w synapsie nerwowo-mięśniowej, są niezwykle toksyczne: przykładem jest „gaz bojowy" sarin, stosowany w wojnie chemicznej.

C. Prawdziwe. Nie posiadające nukleotydów kompleksy $\beta\gamma$ mogą aktywować kanały jonowe, a związana z GTP podjednostka α może aktywować enzymy. Wiążąca GDP trimerowa forma białek G jest nieaktywna.

D. Prawdziwe. PIP_2 zawiera trzy grupy fosforanowe, z których jedna wiąże w lipidzie cukier z diacyloglicerolem. IP_3 powstaje w prostej reakcji hydrolizy.

E. Nieprawdziwe. Kalmodulina wyczuwa wewnątrzkomórkowy poziom Ca^{2+}, ale go nie reguluje [to sformułowanie jest mylące, bowiem w określonym zakresie kalmodulina wiążąc Ca^{2+} obniża poziom wolnego jonu w cytozolu — *przyp. tłum.*].

F. Prawdziwe.

G. Nieprawdziwe. *Ras* jest protoonkogenem. Staje się on onkogenem, tj. wywołuje rozwój nowotworu, jeśli zawiera mutacje, które utrzymują go stale w stanie aktywnym.

H. Prawdziwe. Patrz rys. 15-28.

Odpowiedź 15-11

1. Należałoby oczekiwać wysokiego tła aktywności białka Ras, ponieważ nie może się ono skutecznie wyłączyć.
2. Ponieważ pewne cząsteczki białka Ras mają już związany GTP, aktywność białka Ras jako odpowiedź na zewnątrzkomórkowy sygnał byłaby większa niż zwykle, ale podlegałaby wysyceniu, w momencie gdy wszystkie cząsteczki Ras związałyby GTP.
3. Odpowiedź na sygnał przebiegałaby wolniej, ponieważ zależny od sygnału wzrost ilości białka Ras ze związanym GTP rozpoczynałby się od podwyższonego poziomu tła, jakie stanowi istniejące już uprzednio białko Ras związane z GTP.

Odpowiedź 15-12

A. Oba typy sygnalizacji mogą działać na dużą odległość: neurony mogą przesyłać potencjały czynnościowe wzdłuż bardzo długich aksonów (pomyślmy na przykład o szyi żyrafy), a hormony są rozprowadzane krwiobiegiem po całym organizmie. Ponieważ w synapsie neurony wydzielają duże ilości przekaźników nerwowych do małych, ściśle określonych przestrzeni między dwoma komórkami, stężenia cząsteczek sygnałowych są duże; dlatego wystarcza, że receptory tych przekaźników będą je wiązać z małym powinowactwem. Natomiast hormony, silnie rozcieńczone w krwiobiegu, występują w nim często w minimalnych stężeniach; dlatego też receptory hormonów wiążą swe odpowiednie hormony z niezwykle dużym powinowactwem.

B. O ile sygnalizacja nerwowa jest wydarzeniem „prywatnym", w którym jeden neuron „mówi" do wybranej grupy komórek docelowych przez specyficzne połączenia synaptyczne, o tyle sygnalizacja hormonalna jest wydarzeniem „publicznym", w którym komórki docelowe wyczuwają poziomy hormonów we krwi. Sygnalizacja nerwowa jest bardzo szybka, a ogranicza ją tylko szybkość przesuwania się potencjału czynnościowego i czas potrzebny na pracę synapsy. Natomiast sygnalizacja hormonalna przebiega wolniej, a ograniczona jest szybkością przepływu krwi i czasem potrzebnym do dyfuzji na większe odległości.

Odpowiedź 15-13

A. W komórce jest 100 000 cząsteczek X i 10 000 cząsteczek Y (= szybkość syntezy · przeciętny okres życia).

B. Po jednej sekundzie stężenie X wzrosłoby o 10 000 cząsteczek. Stąd stężenie X będzie wynosić 110 000 cząsteczek na komórkę, co stanowi 10% wzrostu w stosunku do stężenia X przed pobudzeniem jego syntezy. Stężenie Y wzrośnie również o 10 000 cząsteczek, co w odróżnieniu od X stanowi dwukrotny wzrost stężenia (dla uproszczenia możemy pominąć w tych obliczeniach rozpad, ponieważ X i Y są w czasie 1-sekundowej stymulacji stosunkowo stabilne).

C. Ze względu na jej większy proporcjonalnie przyrost, Y będzie lepszą cząsteczką sygnalizacyjną. Obliczenie to ilustruje zaskakującą, lecz ważną zasadę, że czas potrzebny do włączenie sygnału zdeterminowany jest czasem życia cząsteczki sygnałowej.

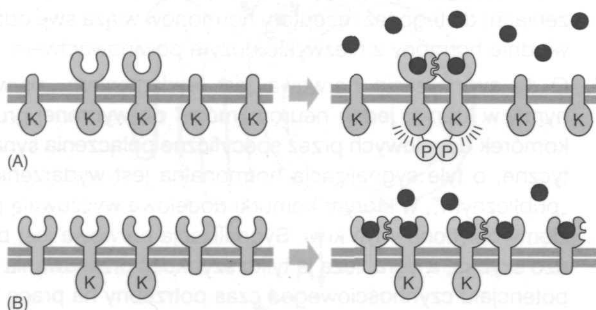
Odpowiedź 15-14. Informacja przekazywana szlakami sygnalizacji komórkowej zawarta jest w *stężeniu* cząsteczki sygnalizacyjnej, którą może być albo mała cząsteczka, albo ufosforylowane białko. Dlatego właśnie, aby wykryć zmianę tego stężenia, oryginalna cząsteczka sygnalizacyjna jest niszczona. Im mniej stabilna jest ta cząsteczka, tym szybciej system może reagować na zmiany. Porozumiewanie się między ludźmi polega na informacjach przekazanych tylko jednokrotnie, przy czym z reguły nie interpretuje się ich częstotliwości, lecz ich

zawartość. Tak więc nie zabijajcie informatorów, bo można ich użyć wielokrotnie.

Odpowiedź 15-15

A. Zmutowana receptorowa kinaza tyrozynowa jest nieaktywna, a jej obecność nie ma żadnych konsekwencji dla funkcjonowania normalnej kinazy receptorowej; zmutowany receptor będąc pozbawiony zewnątrzkomórkowej domeny wiążącej ligand, nie może zostać uaktywniony i dlatego pozostaje bierny.

B. Ten zmutowany receptor jest również nieaktywny, ale jego obecność będzie blokować przepływ sygnalizacji przez prawidłowe receptory. Związanie liganda do któregokolwiek z receptorów będzie powodować ich dimeryzację. Dwa prawidłowe receptory muszą się zejść razem, aby zaktywować się wzajemnie przez fosforylację. Jednakże w obecności nadmiaru receptora zmutowanego prawidłowe receptory będą tworzyć dimery mieszane, w których ich wewnątrzkomórkowe domeny nie mogą ulec aktywacji, ponieważ ich partnerem jest mutant (rys. O15-15).



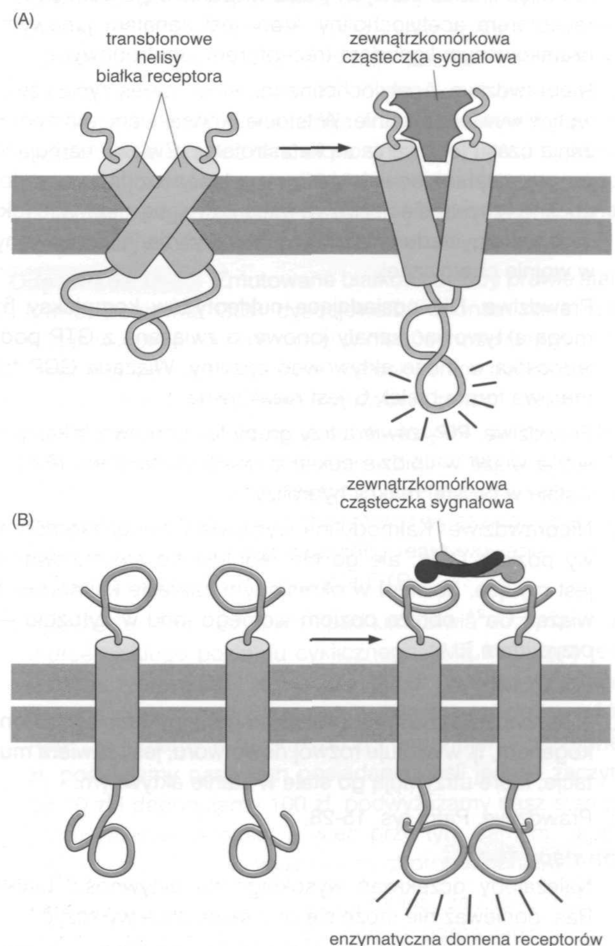
Rys. O15-15

Odpowiedź 15-16. Twierdzenie jest poprawne. Po związaniu liganda transbłonowe helisy wielohelisowych receptorów, jakimi są receptory metabotropowe współpracujące z białkami G, przesuwają się i zmieniają ustawienie względem siebie (rys. O 15-16). Ta zmiana konformacyjna jest odczuwana po drugiej stronie błony jako przemieszczenie pętli cytoplazmatycznych. Pojedynczy segment transbłonowy nie wystarcza do bezpośredniego przekazania sygnału na drugą stronę błony; po związaniu liganda nie ma w tym przypadku możliwości przemieszczenia strukturalnego. Receptory o jednej helisie transbłonowej, takie jak receptorowe kinazy tyrozynowe, dążą do dimeryzacji, przez co ich wewnątrzkomórkowe domeny enzymatyczne ulegają zbliżeniu i mogą się nawzajem aktywować.

Odpowiedź 15-17. W obu przypadkach aktywacja dotyczy białek, które katalizują wymianę GDP/GTP w białku G lub białku Ras. O ile receptory metabotropowe wymuszają taką wymianę na białku G bezpośrednio, o tyle receptory katalityczne zaktywowane przez fosforylację powodują złączenia wielu białek adaptorowych w kompleks sygnalizacyjny, którego jednym z członów jest białko aktywujące już bezpośrednio białko Ras przez taką właśnie wymianę GDP na GTP.

Odpowiedź 15-18. Ze względu na bardzo małe wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{2+} wpłynięcie do cytozolu już niewielkiej ilości jonów Ca^{2+} powoduje dużą zmianę w cytozolowym stężeniu tych jonów. Jak więc, zwiększając stężenie Ca^{2+} jeszcze w zakresie mikromolarnym można uzyskać dziesięciokrotne zwiększenie stężenia Ca^{2+}, co wymaga znacznie mniej jonów, niż byłoby to konieczne do analogicznego zwiększenia stężenia jonów Na^{+}, których jest w cytozolu znacznie więcej. W mięśniu można uzyskać w ciągu mikrosekund ponad dziesięciokrotną zmianę stężenia jonów przez uwolnienie Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowego magazynu, jakim jest retikulum sarkoplazmatyczne; taki efekt byłoby trudno uzyskać, gdyby wymagana była zmiana w zakresie stężeń milimolarnych.

Odpowiedź 15-19. W organizmie wielokomórkowym, np. zwierzęcym, duże znaczenie ma to, że komórki utrzymują się przy życiu tylko wtedy, gdy są potrzebne. Właśnie uzależnienie przeżywania komórek od sygnałów dochodzących z innych komórek może być prostą drogą realizacji takiej zasady. Na przykład komórka źle umieszczona w organizmie przypuszczalnie nie otrzymałaby takich niezbędnych sygnałów (jako że miałaby niewłaściwych sąsiadów) i dlatego popełniłaby samobójstwo. Ta strategia może być również pomocna w regulowaniu liczebności komórek: jeśli przeżycie komórki typu A zależy od sygnału ze strony komórki typu B, to liczebność komórek B będzie decydowała o liczebności komórek A, wysyłając ograniczoną ilość sygnałów decydujących o przeżyciu tak, iż tylko pewna liczba komórek A będzie mogła przeżyć. Rzeczywiście mamy dowody na to, że taki mechanizm bierze udział w regulacji liczebności komórek — zarówno w tkankach dojrzałych, jak i rozwijających się.



Rys. O15-16

Odpowiedź 15-20. Kanały Ca^{2+} aktywowane jonami Ca^{2+} tworzą układ dodatniego sprzężenia zwrotnego: im więcej Ca^{2+} znajdzie się w cytozolu, tym więcej kanałów będzie otwartych. Dlatego też sygnał Ca^{2+} w cytozolu rozprzestrzenia się błyskawicznie w całej komórce mięśniowej, zapewniając prawie idealną synchronizację skurczów wszystkich filamentów miozyna/aktyna.

Odpowiedź 15-21. K2 aktywuje K1. Gdy K1 jest stale aktywna, obserwuje się odpowiedź komórki niezależnie od stanu aktywności K2. Gdyby porządek był odwrotny, K1 musiałaby aktywować K2, co w naszym przykładzie nie może nastąpić, ponieważ K2 zawiera inaktywującą mutację.

Rozdział 16

Odpowiedź 16-1. Komórki, które szybko przemieszczają się z jednego miejsca na drugie, takie jak ameby (A) i plemniki (F) w zasadzie nie potrzebują obecności filamentów pośrednich w swojej cytoplazmie, ponieważ nie rozwijają ani nie podtrzymują dużych sił rozciągających. Komórki roślinne (G) popychane i pociągane przez siłę wiatru i wody, opierają się tym siłom dzięki swoim sztywnym ścianom komórkowym, a nie działaniu cytoszkieletu. Komórki nabłonkowe (B), komórki mięśni gładkich (C) i długie aksony komórek nerwowych (E) są bogate w cytoplazmatyczne filamenty pośrednie, które chronią je przed rozerwaniem, kiedy komórki te są rozciągane i uciskane poprzez ruchy otaczających je tkanek. Wszystkie z wymienionych komórek eukariotycznych mają filamenty pośrednie przynajmniej w swojej blaszce jądrowej. Bakterie, takie jak *Escherichia coli* (D), nie mają w ogóle filamentów pośrednich.

Odpowiedź 16-2. Dwa dimery tubuliny mają wobec siebie powinowactwo mniejsze (z powodu bardziej ograniczonej liczby miejsc interakcji), aniżeli powinowactwo dimeru tubuliny do końca mikrotubuli (gdzie znajduje się wiele możliwych miejsc interakcji, zarówno typu „koniec do końca" — w przypadku dimerów tubuliny przyłączanych do protofilamentów, jak i typu „bok do boku" — w przypadku dimerów tubuliny reagujących z podjednostkami tubuliny w przyległych protofilamentach tworzących pierścieniowe przekroje poprzeczne). Stąd, aby zainicjować powstawanie mikrotubuli od nowa, dostateczna liczba dimerów tubuliny musi znaleźć się razem i pozostać ze sobą związana przez odpowiednio długi czas, żeby inna cząsteczka tubuliny mogła się do nich przyłączyć. Tylko wtedy gdy pewna liczba dimerów tubuliny połączyła się już ze sobą, przyłączenie się następnej podjednostki będzie ułatwione. Dlatego też tworzenie tych początkowych „miejsc nukleacji" następuje rzadko i nie zachodzi spontanicznie w komórkowych stężeniach tubuliny.

Centrosomy zawierają wstępnie zmontowane pierścienie γ-tubuliny (w których podjednostki γ-tubuliny są utrzymywane razem oddziaływaniami typu „bok do boku" znacznie bardziej ścisłymi niż te, które mogą powstawać między dimerami $\alpha\beta$-tubuliny), do których dimery $\alpha\beta$-tubuliny mogą być wiązane. Warunki wiązania $\alpha\beta$-tubulinowych dimerów są podobne do tych, które są konieczne do łączenia się ich z końcem montowanej mikrotubuli. Pierścienie γ-tubuliny w centrosomie mogą stąd być uważane za stałe formy wstępnie utworzonych miejsc nukleacji.

Odpowiedź 16-3

A. Mikrotubula skraca się, ponieważ utraciła swoją czapeczkę GTP, co oznacza, że wszystkie podjednostki tubuliny na jej końcu są w postaci form związanych z GDP. Podjednostki tubuliny z roztworu z dołączonym GTP będą stale przyłączane do tego końca, ale ich okres przeżycia będzie krótki — albo dlatego, że hydrolizują swój GTP, lub dlatego, że rąbek mikrotubuli wokół nich ulega demontażowi. Jednakże, jeśli dostateczna ilość podjednostek tubuliny–GTP łączy się wystarczająco szybko, aby zakryć na końcu mikrotubuli podjednostki tubuliny zawierające GDP, może się utworzyć nowa czapeczka GTP i pojawia się ponowna tendencja wzrostowa.

B. Tempo przyłączania tubuliny–GTP będzie większe, gdy większe będą stężenia tubuliny. Dlatego też częstotliwość, z jaką skracające się mikrotubule przestawią się na proces wzrostu, zwiększy się wraz ze stężeniem tubuliny. Konsekwencją tej regulacji jest to, że system ten jest samorównoważący się: im więcej mikrotubul skraca się (co powoduje zwiększenie stężenia wolnej tubuliny), tym częściej mikrotubule zaczynają rosnąć na nowo. I na odwrót, im więcej mikrotubul rośnie, tym bardziej zmniejsza się stężenie wolnej tubuliny i tempo przyłączania tubuliny–GTP słabnie; w pewnym momencie hydroliza GTP będzie zrównoważona przez przyłączanie nowych tubulin–GTP; czapeczka GTP ulegnie zniszczeniu i mikrotubula zacznie się skracać.

C. Jeśli obecny byłby tylko GDP, mikrotubule kontynuowałyby proces skracania się i ostatecznie zniknęły, ponieważ dimery tubuliny z GDP mają bardzo małe powinowactwo względem siebie i nie połączyłyby się trwale z mikrotubulami.

D. Jeśli GTP jest obecny, ale nie jest w stanie ulec hydrolizie, mikrotubula będzie kontynuowała swój wzrost do momentu, kiedy wszystkie wolne podjednostki tubuliny zostaną zużyte.

Odpowiedź 16-4. Jeśli wszystkie ramiona dyneiny byłyby jednakowo aktywne, nie byłoby wyraźnego ruchu jednej tubuli względem drugiej, co jest niezbędne do ruchu ugięcia rzęski (pomyśl o kręgu dziewięciu ciężarowców, z których każdy próbuje podnieść swojego sąsiada z ziemi: jeśli uda się to wszystkim, to cała grupa zacznie lewitować!). Stąd, kilka cząsteczek rzęskowej dyneiny musi być aktywowanych wybiórczo po jednej stronie rzęski. Kiedy popychają swoje sąsiadujące mikrotubule w kierunku szczytu rzęski, rzęska ugnie się od strony zawierającej zaktywowane dyneiny w stronę przeciwną.

Odpowiedź 16-5. Każde białko wiążące się z aktyną, które stabilizuje kompleksy dwóch lub więcej monomerów aktyny bez blokowania końców niezbędnych do wzrostu filamentu, będzie ułatwiało inicjację nowego filamentu (nukleację).

Odpowiedź 16-6. Komórki zawierające białka wiążące się z aktyną, które łączą w pęczki i krzyżowo filamenty aktynowe (patrz rys. 16-27). Filamenty rozciągające się z lamellipodiów i filopodiów pozostają ściśle związane z siecią kory komórki, co tworzy mechaniczną kotwicę niezbędną do wzrostu pałeczkopodobnych filamentów w celu zdeformowania błony komórkowej.

Odpowiedź 16-7. Oba filamenty są zbudowane z podjednostek w postaci białkowych dimerów, które są utrzymywane razem poprzez interakcje w superhelisie. Ponadto, w obu przypadkach

dimery polimeryzują tworząc filamenty poprzez swoje superhelikalne domeny. Gdy filamenty pośrednie łączą się głowa do głowy, tworząc następnie filament, który nie jest spolaryzowany, to wszystkie cząsteczki miozynowe w tej samej połowie miozynowego filamentu są skierowane głowami w tym samym kierunku. Ta polarność jest konieczna, aby mogły się wytworzyć siły skurczowe w mięśniu.

Odpowiedź 16-8

A. Kolejne cząsteczki aktyny w filamencie aktynowym są identyczne co do umiejscowienia i konformacji. Nie istnieje system, który po związaniu pierwszego białka (troponiny) do filamentu aktynowego pozwoliłby następnej cząsteczce białka rozpoznać każdy co siódmy monomer nagiego filamentu aktynowego. Jednakże wzdłuż filamentu aktynowego odkłada się tropomiozyna, wymierzając precyzyjnie siedem monomerów i stanowiąc molekularną „linijkę", odmierzającą długość siedmiu monomerów aktyny. Troponina zostaje umiejscowiona poprzez związanie z końcem cząsteczki tropomiozyny.

B. Jony wapnia wpływają na wytwarzanie siły w systemie aktyna/miozyna tylko wtedy, gdy są obecne zarówno troponina (wiążąca jony wapnia), jak i tropomiozyna (przekazująca informację do filamentu, że troponina związała wapń). a) Troponina nie jest w stanie związać się z aktyną w nieobecności tropomiozyny. Filament aktynowy byłby stale eksponowany na działanie miozyny i system ten byłby ciągle aktywny, niezależnie od tego, czy jony wapnia byłyby obecne, czy nie (stąd komórka mięśniowa byłaby w stanie ciągłego skurczu bez możliwości regulacji tego procesu). b) Tropomiozyna związałaby się z aktyną i zablokowała całkowicie wiązanie miozyny; system pozostawałby stale nieaktywny, bez względu na to, czy jony wapnia byłyby obecne, ponieważ wapń nie wpływa na tropomiozynę. c) System skurczy się w odpowiedzi na obecność jonów wapnia.

Odpowiedź 16-9

A. Prawdziwe. Niezbędne jest ciągłe odśrodkowe przemieszczanie retikulum endoplazmatycznego; w nieobecności mikrotubul ER zapada się w kierunku środka komórki.

B. Prawdziwe. Aktyna jest niezbędna, aby utworzyć pierścień skurczowy, który powoduje fizyczny podział na dwie komórki potomne, natomiast wrzeciono mitotyczne, które rozdziela chromosomy, jest zbudowane z mikrotubul.

C. Prawdziwe. Oba rodzaje macek są związane z białkami transbłonowymi, które wystają z błony komórkowej i umożliwiają komórce utworzenie nowych punktów zaczepienia na podłożu.

D. Nieprawdziwe. Aby spowodować ugięcie, ATP jest hydrolizowany przez białko motoryczne — dyneinę, której cząsteczki są przyczepione do zewnętrznych mikrotubul w wici.

E. Nieprawdziwe. Komórki nie mogłyby podzielić się bez rearanżacji swoich pośrednich filamentów, ale istnieje wiele ostatecznie zróżnicowanych i długo żyjących komórek, takich jak komórki nerwowe, które mają stabilne filamenty pośrednie, nie ulegające depolimeryzacji.

F. Nieprawdziwe. Tempo wzrostu jest niezależne od wielkości czapeczki GTP. Końce plus i minus mają różne szybkości wzrostu, ponieważ mają fizycznie odmienne miejsca wiążące dla napływających podjednostek tubuliny; szybkość przyłączania podjednostek tubulinowych różni się przy obu końcach.

G. Prawdziwe. Oba są dobrymi przykładami tego, jak ta sama błona może mieć regiony wysoce wyspecjalizowane w poszczególnych funkcjach.

H. Nieprawdziwe. Ruch miozyny jest aktywowany poprzez fosforylację łańcuchów lekkich miozyny lub przez związanie wapnia do troponiny.

Odpowiedź 16-10. Średni czas, który potrzebuje mała cząsteczka (taka jak ATP) do przebycia odległości 10 μm w drodze dyfuzji, można określić stosując obliczenie:

$$(10^{-3})^2/\ (2 \cdot 5 \cdot 10^{-6}) = 0{,}1\ \mathrm{s}$$

Analogicznie, białko potrzebuje średnio 1 sekundy, a pęcherzyk 10 sekund do przebycia 10 μm. Pęcherzyk wymagałby średnio 10^9 sekund lub więcej niż 30 lat, aby w drodze dyfuzji osiągnąć zakończenie aksonu o długości 10 cm. Ta kalkulacja wyjaśnia, dlaczego w drodze ewolucji powstały kinezyny i inne białka motoryczne służące do przenoszenia cząsteczek i organelli wzdłuż mikrotubul.

Odpowiedź 16-11. 1. Komórki zwierzęce są znacznie większe, różnie ukształtowane i nie mają ściany komórkowej. Elementy cytoszkieletu są niezbędne w utrzymywaniu mechanicznej wytrzymałości i kształtu, gdy brak ściany komórkowej. 2. Komórki zwierzęce i inne komórki eukariotyczne mają jądro, którego kształt i utrzymywanie pozycji w obrębie komórki zależy od filamentów pośrednich; blaszki jądrowe przyczepione od strony karioplazmy do wewnętrznej błony jądrowej wspierają i kształtują otoczkę jądrową, a sieć filamentów pośrednich otacza jądro i przenika całą cytoplazmę. 3. Komórki zwierzęce mogą się poruszać mechanizmem wymagającym zmiany kształtu komórki. Filamenty aktynowe i miozynowe białka motoryczne są niezbędne do tej aktywności. 4. Komórki zwierzęce mają znacznie większy genom aniżeli bakterie; ten genom jest rozdzielony na wiele chromosomów. W trakcie podziału komórki chromosomy muszą być równo rozdzielone między komórki potomne, co wymaga udziału mikrotubul, które formują wrzeciono mitotyczne. 5. Komórki zwierzęce mają organelle wewnętrzne. Ich umiejscowienie w komórce zależy od białek motorycznych, które przesuwają je wzdłuż mikrotubul. Dobitnym przykładem jest długodystansowa podróż pęcherzyków błonowych wzdłuż mikrotubul w aksonie, który może mieć długość do 1 m w przypadku komórek nerwowych rozciągających się od rdzenia kręgowego do twoich stóp.

Odpowiedź 16-12. Końce filamentów pośrednich są nie do odróżnienia jeden od drugiego, gdyż filamenty są zbudowane przez łączenie się symetrycznych tetramerów utworzonych przez dwa superhelikalne dimery. W odróżnieniu od mikrotubul i filamentów aktynowych, filamenty pośrednie nie są spolaryzowane.

Odpowiedź 16-13. Filamenty pośrednie nie są spolaryzowane; ich końce są chemicznie nie do odróżnienia. Dlatego trudno byłoby wyobrazić sobie, jak hipotetyczne białko motoryczne wiążąc się ze środkiem filamentu mogłoby wyczuć określony kierunek. Takie białko motoryczne po związaniu się z fila-

mentem miałoby szansę orientować się zarówno w kierunku jednego, jak i drugiego końca.

Odpowiedź 16-14. Katanina tnie poprzecznie mikrotubule wzdłuż całej ich długości, ale i z daleka od ich czapeczek GTP. Stąd fragmenty, które powstają, zawierają GDP na swoich eksponowanych końcach i szybko ulegają depolimeryzacji. Katanina jest bardzo szybko działającym czynnikiem niszczącym istniejące mikrotubule.

Odpowiedź 16-15. Podział komórki zależy od zdolności mikrotubul zarówno do polimeryzacji, jak i depolimeryzacji. Jest to oczywiste, jeśli rozważymy, że tworzenie wrzeciona mitotycznego wymaga uprzedniej depolimeryzacji innych mikrotubul komórkowych w celu uwolnienia tubuliny niezbędnej do zbudowania wrzeciona. Ta rearanżacja nie jest możliwa w komórkach poddanych działaniu taksolu, natomiast w komórkach poddanych działaniu kolchicyny podział jest zablokowany, gdyż wrzeciono nie może być utworzone. Oba leki blokują dynamiczną niestabilność mikrotubul i dlatego przeszkadzają działaniu wrzeciona mitotycznego, nawet jeśli ono ukształtuje się prawidłowo.

Odpowiedź 16-16. Białka motoryczne są jednokierunkowe w swoim działaniu; kinezyny zawsze poruszają się w kierunku końca plus mikrotubul, a dyneiny w kierunku końca minus. Stąd jeśli cząsteczki kinezyny są przyczepione do szkła, tylko te z pojedynczych motorów, które wykazują właściwą orientację względem mikrotubul osiadłych na nich, przyczepiają się do mikrotubul i wywierają siłę popychającą je naprzód. Skoro kinezyna porusza się w kierunku końca plus mikrotubul, mikrotubula zawsze będzie pełznąć w kierunku wyznaczonym przez koniec minus ponad szkiełkiem nakrywkowym.

Odpowiedź 16-17

A. Faza A odpowiada fazie opóźnienia, podczas której cząsteczki tubuliny łączą się tworząc ośrodki nukleacji (rys. O16-17[A]). Po nukleacji następuje faza szybka (faza B) do momentu osiągnięcia plateau, ponieważ dimery tubuliny są dodawane do końców wydłużających się mikrotubul (rys. O16-17[B]). W fazie C jest osiągana równowaga, niektóre mikrotubule rosną, inne natomiast skracają się (rys. O16-17[C]). Stężenie wolnej tubuliny jest stałe w tym momencie, ponieważ polimeryzacja i depolimeryzacja równoważą się (patrz także pytanie 16-3, s. 527).

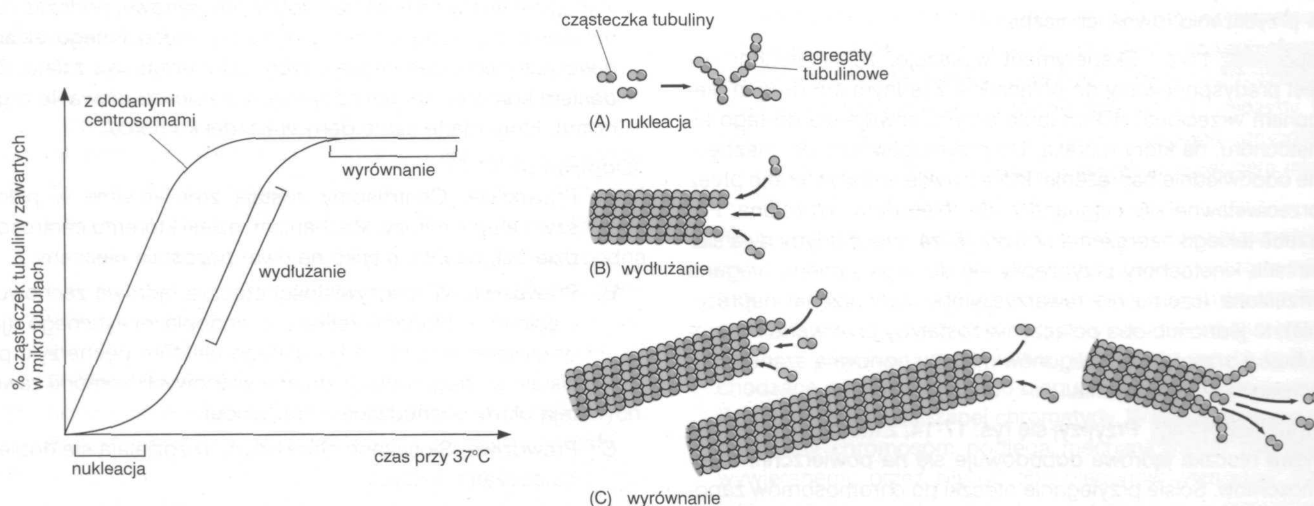
B. Dodanie centrosomów wprowadza miejsca nukleacji, które eliminują fazę opóźnienia A, jak to pokazano *czerwoną krzywą* na rys. O16-17. Szybkość wzrostu mikrotubul (tj. nachylenie krzywej w fazie wydłużania B) i poziom równowagi wolnej tubuliny pozostają nie zmienione, ponieważ obecność centrosomów nie wpływa na szybkość polimeryzacji i depolimeryzacji.

Odpowiedź 16-18. Koniec skracającej się mikrotubuli jest wyraźnie wystrzępiony, a poszczególne protofilamenty rozpadają się na kawałki i zwijają się, gdy kończy się depolimeryzacja. Tak więc mikrografia ta sugeruje, że czapeczka GTP (która została utracona przez skracającą mikrotubulę) utrzymuje protofilamenty w równoległym do siebie ułożeniu, prawdopodobnie poprzez wzmocnienie interakcji bok do boku między podjednostkami αβ-tubuliny, gdy występują one w formie związanej z GTP.

Odpowiedź 16-19. Cytochalazyna przeszkadza tworzeniu filamentów aktynowych, a jej wpływ na komórkę dowodzi znaczenia aktyny w lokomocji komórki. Eksperyment z kolchicyną ukazuje, że mikrotubule są niezbędne w nadawaniu komórce polarności, co następnie determinuje, który koniec stanie się końcem wiodącym (patrz rys. 16-13). Gdy brak mikrotubul, komórki ciągle wykonują ruchy związane z przemieszczaniem się, takie jak wydłużanie lamellipodiów, lecz gdy brak polarności komórki, są to próby daremne, ponieważ pojawiają się bez różnicy we wszystkich kierunkach. Przeciwciała wiążą się ściśle z antygenem (w tym przypadku z wimentyną), względem którego je wytworzono (patrz panel 5-3, s. 158–159). Po związaniu przeciwciało może wpływać na funkcję antygenu zapobiegając jego właściwym interakcjom z innymi składnikami komórki. Eksperyment z podaniem przeciwciał sugeruje, że filamenty pośrednie nie są potrzebne do utrzymywania polarności komórki lub też do maszynerii ruchowej.

Odpowiedź 16-20. Zarówno (B), jak i (C) uzupełniają zdanie poprawnie. Bezpośrednim wynikiem działania potencjału czynnościowego w błonie komórkowej jest uwolnienie Ca^{2+} do cytozolu z retikulum sarkoplazmatycznego; ten szybki wzrost cytozolowego Ca^{2+} uruchamia skurcz komórki mięśniowej. Jo-

Rys. O16-17



ny wapnia w dużych stężeniach wiążą się z troponiną, co powoduje, że tropomiozyna przesuwa się odsłaniając miejsca wiązania miozyny na filamencie aktynowym. (A) i (D) byłyby nieodpowiednie, gdyż Ca^{2+} nie wywierają wpływu na odłączenie głów miozyny od aktyny, co jest wynikiem hydrolizy ATP. Nie ma też żadnego znaczenia dla utrzymywania struktury filamentu miozynowego.

Odpowiedź 16-21. Tylko odpowiedź (D) jest poprawna. Podczas skurczu dyski Z przesuwają się bliżej do siebie, a filamenty aktynowe i filamenty miozynowe nie kurczą się. Odpowiedź na to pytanie stanie się bardziej jasna, jeśli powtórnie przyjrzysz się rys. 16-35 i 16-36.

Rozdział 17

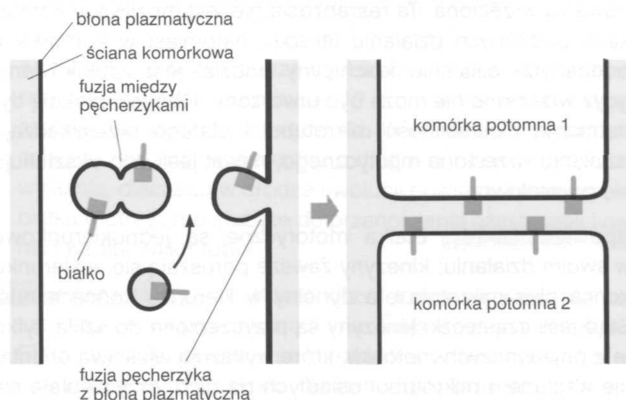
Odpowiedź 17-1. Komórki w wierzchołku B zawierają dwukrotnie więcej DNA niż w wierzchołku A, co wskazuje, że zawierają zreplikowany DNA, natomiast komórki z wierzchołka A mają DNA niezreplikowany. Wynika z tego, że wierzchołek A zawiera komórki znajdujące się w fazie G_1, a wierzchołek B komórki, które są w fazie G_2 i w mitozie. Komórki w fazie S zaczęły, ale nie ukończyły syntezy DNA; dlatego mają zróżnicowane pośrednie ilości DNA i są znajdywane na obszarze między wierzchołkami A i B. Większość komórek jest w fazie G_1, co wskazuje, że jest to najdłuższa faza cyklu komórkowego (patrz rys. 17-4).

Odpowiedź 17-2. U organizmów eukariotycznych informacja genetyczna, potrzebna do przeżycia i reprodukcji, jest rozmieszczona w wielu chromosomach. Jest więc sprawą zasadniczą, aby każda komórka potomna otrzymała kopię każdego chromosomu w czasie podziału komórkowego; jeśli komórka potomna otrzyma zbyt wiele lub zbyt mało chromosomów, to skutki są szkodliwe lub nawet śmiertelne. Tylko dwie kopie każdego chromosomu są wytwarzane przez replikację chromosomów w czasie mitozy. Gdyby komórka rozdzielała przypadkowo chromosomy w czasie podziału, to byłoby wielce nieprawdopodobne, by każda komórka potomna otrzymała precyzyjnie jedną kopię każdego chromosomu. Przeciwnie, aparat Golgiego rozpada się na wiele tysięcy podobnych pęcherzyków i jest bardzo prawdopodobne, że ich przypadkowy rozdział spowoduje, iż każda komórka potomna otrzyma w przybliżeniu równą ich liczbę.

Odpowiedź 17-3. Eksperyment wykazuje, że kinetochor nie jest predysponowany do połączenia z jednym lub drugim biegunem wrzeciona; mikrotubule przymocowują się do tego kinetochoru, na który natrafią. Do przymocowania jest niezbędne odpowiednie naprężenie, które zwykle jest wywierane przez przeciwstawne siły ciągnące z obu biegunów wrzeciona. Potrzeba takiego naprężenia powoduje, że nawet gdyby dwa siostrzane kinetochory przyczepiły się do tego samego bieguna wrzeciona (czemu nie towarzyszyłoby wytworzenie naprężenia), to jedno lub oba połączenia zostałyby przerwane i mikrotubule z przeciwnych biegunów miałyby ponowną szanse właściwego przymocowania.

Odpowiedź 17-4. Przyjrzyj się rys. 17-14, z którego wynika, że nowa otoczka jądrowa odbudowuje się na powierzchni chromosomów. Ścisłe przyleganie otoczki do chromosomów zapobiega zatrzymaniu białek cytozolowych między chromosomami i otoczką. Białka jądrowe są następnie selektywnie transportowane poprzez pory w otoczce jądrowej i powodują powiększanie jądra z zachowanem jego charakterystycznego składu białkowego.

Odpowiedź 17-5. Błony pęcherzyków Golgiego ulegają fuzji, aby utworzyć nową błonę komórkową w obu komórkach potomnych. Wnętrza pęcherzyków, które są wypełnione materiałem na ścianę komórkową, stają się matriks nowej ściany komórkowej w obu komórkach potomnych. Białka w błonach pęcherzyków Golgiego stają się białkami błon komórkowych. Te białka, które są eksponowane do światła pęcherzyków Golgiego, będą zwrócone do nowej ściany komórkowej (rys. O17-5).



Rys. O17-5

Odpowiedź 17-6. Chociaż każda komórka potomna kończy pierwszy podział mejotyczny z diploidalną ilością DNA, każda ma tylko haploidalny zestaw chromosomów (aczkolwiek w dwóch kopiach), reprezentujących tylko jeden z dwóch chromosomów homologicznych każdego typu (w czasie crossing-over zaszła pewna wymiana między nimi). Ponieważ chromosomy matczyne i ojcowskie w każdej parze przenoszą odmienne wersje wielu genów (jak omówiono w rozdz. 9), komórki potomne nie będą identyczne genetycznie. Przeciwnie, komórki somatyczne dzielące się na drodze mitozy dziedziczą diploidalny zestaw chromosomów i wszystkie komórki potomne są identyczne genetycznie. Zadaniem gamet wytwarzanych w mejozie jest wymieszanie i dobór puli genowej podczas rozmnażania płciowego, toteż posiadanie nieco innego składu genetycznego przez każdą z nich jest niewątpliwą zaletą. Zadaniem komórek somatycznych jest z kolei zbudowanie organizmu, który ma te same geny w każdej komórce.

Odpowiedź 17-7

A. Prawdziwe. Centrosomy zostają zreplikowane w pierwszym etapie mitozy. Mechanizm, dzięki któremu centrosom dzieli się na dwa (i tylko na dwa) pozostaje nieznany.

B. Prawdziwe. W rzeczywistości otoczka jądrowa zachowuje ciągłość z błonami retikulum endoplazmatycznego (jak omówiono w rozdz. 14) i dlatego niektóre pęcherzyki powstałe po fragmentacji struktur błonowych komórki zawierają błony pochodzące z obu źródeł.

C. Prawdziwe. Siostrzane chromatydy rozdzielają się dopiero na początku anafazy.

D. Prawdziwe. Gamety powstające w mejozie są haploidalne.

E. Nieprawdziwe. Zakończenia mikrotubul biegunowych zachodzą za siebie i przymocowują się za pomocą mostków białkowych pomiędzy mikrotubulami.

F. Nieprawdziwe. Mikrotubule nie odgrywają żadnej roli w czasie replikacji DNA.

G. Nieprawdziwe. Poprawne twierdzenie powinno brzmieć: Mikrotubule tworzą się w centrosomach i następnie przyłączają się do kinetochoru, który jest strukturą w centromerowym rejonie chromosomu.

Odpowiedź 17-8. Ponieważ wszystkie komórki powstają w wyniku podziału innej komórki, to twierdzenie jest poprawne, jeżeli przyjmiemy, że „pierwszy podział komórkowy" odnosi się do podziału pierwszej wyjściowej komórki, od której można wywieść życie we wszystkich znanych formach. Prawdopodobnie było wiele innych, nieudanych prób rozpoczęcia łańcuchów życia.

Odpowiedź 17-9. Gdy założymy, że populacja komórek rośnie wykładniczo, podwajając swoją masę w każdym podziale komórkowym, to masa skupienia komórek po N podziałach komórkowych wynosi $2^N \cdot 10^{-9}$ g. Stąd, 70 kg ($70 \cdot 10^3$ g) $= 2^N \cdot 10^{-9}$ g, czyli po przekształceniu $2^N = 7 \cdot 10^{13}$. W celu rozwiązania równanie logarytmujemy obustronnie, otrzymując $N = \ln(7 \cdot 10^{13}) / \ln 2 = 46$, tj. masę 70 kg komórki osiągną już po 46 dniach, jeśli ich wzrost będzie wykładniczy. Jednak podziały komórkowe u zwierząt są ściśle kontrolowane i większość komórek u człowieka przestaje się dzielić po osiągnięciu wysokiej specjalizacji. Ten przykład ilustruje, że wykładniczy wzrost komórek występuje tylko przez bardzo krótki okres, nawet *w czasie rozwoju embrionalnego*.

Odpowiedź 17-10. Właściwy porządek zdarzeń jest następujący: G, C, B, A, D. Razem te pięć etapów określa się mianem mitozy (F). Żaden z etapów mitozy nie podlega wpływom faz Księżyca (E).

Odpowiedź 17-11. Komórki jajowe przeważnie są duże i zawierają wystarczająco dużo składników komórkowych, by przejść wiele podziałów komórkowych. Komórki potomne, które powstają w czasie pierwszych podziałów komórkowych następujących *po zapłodnieniu jaja, stają się coraz mniejsze i dlatego* nie ma potrzeby syntezy nowych białek lub RNA. Gdy normalnie dzielące się komórki czekają w fazie G_1 i G_2 na podwojenie rozmiarów, to obu faz G_1 i G_2 właściwie nie ma w czasie pierwszych podziałów komórek jajowych. Ponieważ faza G_1 jest zwykle dłuższa niż G_2, to ona jest najbardziej zredukowana.

Odpowiedź 17-12

A. Wrzeciono mitotyczne jest budowane z mikrotubul w każdej komórce eukariotycznej. Bakterie nie mają mikrotubul, a ich zreplikowane chromosomy są przydzielane do komórek potomnych przez przyczepienie do błony komórkowej.

B. Zarówno komórki bakteryjne, jak i eukariotyczne muszą zreplikować swój DNA, zanim będą się mogły podzielić.

C. Bakterie nie dzielą się mejotycznie. Mejoza jest niezbędna u eukariotów do wytworzenia haploidalnych gamet z komórek diploidalnych. Ponieważ bakterie zawierają tylko jeden chromosom, nie można u nich wskazać niczego, co przypominałoby mejozę.

D. Mitoza jest podziałem jądra w komórkach eukariotycznych. Bakterie nie mają jądra i dzielą się przez podział prosty.

E. Synteza nowej ściany komórkowej jest niezbędna, by komórka bakteryjna mogła się podzielić i jest ona częścią mechanizmu rozdzielania zreplikowanych chromosomów bakteryjnych. Również w komórkach roślinnych do zajścia cytokinezy jest potrzebna synteza nowej ściany komórkowej.

F. Zarówno komórki bakteryjne, jak i eukariotyczne powiększają się przed podziałem.

G. W komórkach eukariotycznych otoczka jądrowa rozpada się na początkowym etapie mitozy i zostaje odtworzona wokół rozdzielonych chromosomów po zakończeniu mitozy.

Odpowiedź 17-13. Jeśli szybkość wzrostu mikrotubul jest taka sama w komórce w czasie mitozy i interfazy, ich długość jest proporcjonalna do czasu ich życia. Dlatego, przeciętna długość mikrotubul w czasie mitozy wynosi 1 μm (= 20 μm·15 s/300 s). Jeśli mikrotubule są przeciętnie 20 razy krótsze, lecz zawierają tę samą liczbę monomerów tubuliny, to wtedy musi być 20 razy więcej mikrotubul albo 2000 miejsc nukleacji przypadających na centrosom w czasie mitozy.

Odpowiedź 17-14. Dwie kopie tego samego chromosomu mogą się pojawić w jednej komórce potomnej wtedy, gdy jedno z połączeń mikrotubulowych pęknie przed rozdzieleniem siostrzanych chromatyd. Alternatywnie, do obu kinetochorów chromosomu mogą się przyczepić mikrotubule biegnące od tego samego bieguna wrzeciona. W konsekwencji tego drastycznego, a zarazem rzadkiego błędu jedna komórka potomna miałaby tylko jedną kopię wszystkich genów zawartych w tym chromosomie, natomiast druga komórka potomna otrzymałaby trzy kopie. Zmiana dawki genów, prowadząca do *odpowiednio zmienionej ilości powstającego mRNA i białek*, jest w wielu przypadkach szkodliwa dla komórki. Jeśli błąd pojawi się w czasie mejozy, tj. w procesie tworzenia gamet, będzie się on szerzył we wszystkich komórkach organizmu (powstałego z takiej gamety — *przyp. tłum.*). Na przykład, ostre przypadki upośledzenia umysłowego zwane zespołem Downa są wynikiem obecności trzech kopii chromosomu 21 we wszystkich komórkach jądrzastych ciała.

Odpowiedź 17-15. Przeciwciała są mocno wiązane przez antygen, przeciwko któremu były wytworzone (w tym wypadku miozynę). Jeśli tylko przeciwciało zostanie związane, może zakłócać funkcje antygenu poprzez uniemożliwianie właściwych interakcji z innymi elementami komórkowymi. a) Ruch chromosomów w anafazie zależy od mikrotubul, natomiast nie zależy od aktyny i miozyny. Dlatego iniekcja do komórki przeciwciała przeciwko miozynie nie będzie miała wpływu na ruch chromosomów. b) Z drugiej strony, cytokineza zależy od zmontowania pierścienia zbudowanego z filamentów aktyny i miozyny, którego skurcz tworzy bruzdę podziałową, dzielącą komórkę na dwie potomne. Dlatego iniekcja przeciwciał przeciwko miozynie będzie blokowała cytokinezę.

Odpowiedź 17-16. Siostrzana chromatyda zostaje przydzielona do określonej komórki potomnej w momencie, gdy mikrotubula od jednego z biegunów wrzeciona przyczepi się do kinetochoru na chromatydzie. Przyczepienie mikrotubuli jest zjawiskiem *odwracalnym do chwili, gdy druga mikrotubula* pochodząca od przeciwległego bieguna wrzeciona przyczepi się do kinetochoru siostrzanej chromatydy. W tym momencie zduplikowany chromosom podlega mechanicznemu naprężeniu wywieranemu przez siły od obu biegunów wrzeciona. Dzięki temu naprężeniu obie mikrotubule pozostają przymocowane

do chromosomu. Pozycja chromosomu w komórce w chwili zaniku otoczki jądrowej będzie wpływała na to, do którego z biegunów będzie przyciągana chromatyda, kinetochor bowiem z największym prawdopodobieństwem zostanie przyczepiony do tego bieguna, do którego jest zwrócony.

Odpowiedź 17-17. Mejoza zaczyna się od replikacji DNA, dzięki czemu powstaje komórka tetraploidalna zawierająca cztery kopie każdego chromosomu. Te cztery kopie muszą zostać równo rozdzielone w czasie dwóch następujących po sobie podziałów mejotycznych do czterech komórek haploidalnych. Siostrzane chromatydy pozostają połączone w pary, toteż 1) komórki powstałe po pierwszym podziale otrzymają dwa kompletne zestawy chromosomów i 2) chromosomy mogą zostać ponownie równo rozdzielone w drugim podziale mejotycznym. Jeśli siostrzane chromatydy nie pozostawałyby w parach, nie byłoby możliwe w trakcie drugiego podziału ustalenie, które chromatydy należą do siebie i dlatego trudno byłoby zapewnić precyzyjne przydzielenie jednej kopii każdej chromatydy do każdej komórki potomnej. Utrzymywanie dwóch siostrzanych chromatyd w parach w czasie pierwszego podziału mejotycznego jest zatem prostym sposobem śledzenia, które chromatydy należą do siebie.

Ta zasada biologiczna sugeruje, że rozważne byłoby pospinanie skarpetek w pasujące do siebie pary przed oddaniem ich do pralni. W ten sposób można by uniknąć nieporęcznego procesu ich sortowania po praniu, a zwłaszcza błędów, które w trakcie tego działania niewątpliwie mogłyby się zdarzyć.

Odpowiedź 17-18. Dwa alternatywne modele tłumaczące, jak kinetochor może w czasie anafazy A wytwarzać dobiegunową siłę działającą na jego macierzysty chromosom, są pokazane na rys. O17-18. W modelu (A) białka motoryczne mikrotubul są częścią kinetochoru i wykorzystują hydrolizę ATP do przeciągania chromosomu wzdłuż związanej mikrotubuli. W modelu (B) ruch chromosomu jest wywoływany przez demontaż mikrotubuli: gdy podjednostki tubuliny oddysocjowują, kinetochor musi ślizgać się dobiegunowo w celu zachowania swego przyczepienia do ścian mikrotubuli.

Rozdział 18

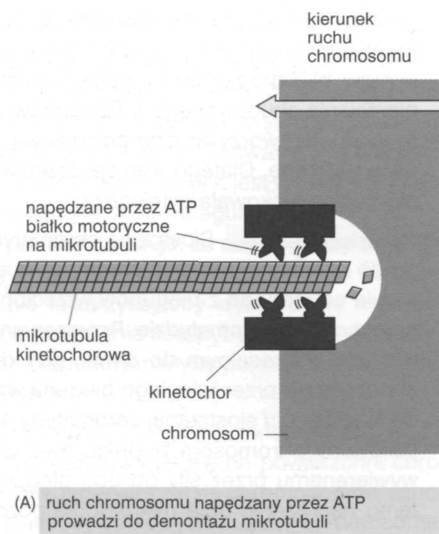
Odpowiedź 18-1. Dokładna odpowiedź na pytanie o mechanizm punktu sprawdzania wielkości komórki w G_1 nie jest znana, można jednak ogólnie wyobrazić sobie, jak mógłby on działać. Zawartość DNA w komórce pozostającej w G_1 nie zmienia się. Stąd stężenie DNA w stosunku do składników cytoplazmy stopniowo zmniejsza się w miarę powiększania się komórki w G_1. Ponieważ wielkość określonego typu komórki jest w przybliżeniu proporcjonalna do jej zawartości DNA, można sugerować, że mechanizm kontroli zależy od porównania ilości składników cytoplazmy do ilości DNA. Cykl komórkowy jest opóźniany do chwili, w której biosyntezy odpowiedzialne za wzrost komórki doprowadzają do osiągnięcia progowej wartości stosunku jednego lub kilku składników cytoplazmy do masy DNA.

Odpowiedź 18-2. Oocyty żaby muszą zawierać nieaktywną formę czynnika MPF (jako nieaktywne kompleksy cyklina–Cdk). Wstrzyknięta do nowego oocytu mała ilość aktywnego MPF, aktywuje większą pulę nieaktywnego MPF poprzez regulację enzymów, które w odpowiednich miejscach fosforylują i defosforylują nieaktywny MPF (patrz rys. 18-10). Dlatego wyciąg drugiego oocytu, będącego teraz w fazie M, zawiera tyle samo aktywnego MPF, co wyjściowy wyciąg cytoplazmatyczny i tak dalej.

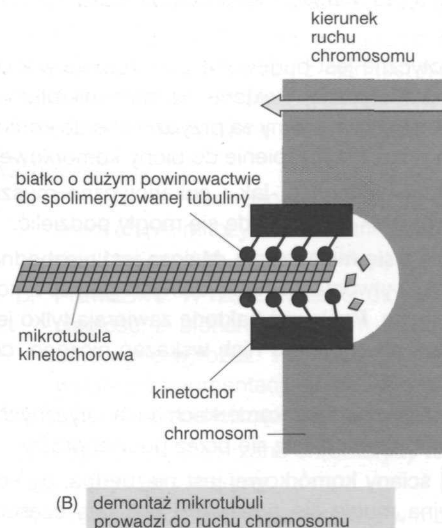
Odpowiedź 18-3. W organizmie wielokomórkowym kontrola podziałów komórkowych jest niezmiernie ważna. Pojedyncze komórki nie powinny się dzielić, jeśli nie jest to z korzyścią dla całego organizmu. Stan G_0 chroni przed zaburzoną aktywacją podziału komórki, ponieważ układ kontroli cyklu jest wtedy prawie całkowicie zdemontowany. Gdyby komórka zatrzymywała się tylko w G_1, to zawierając wszystkie części aparatu kontroli cyklu mogłaby zostać pobudzona do podziału. Musiałaby też stale powtarzać „decyzję" o niedzieleniu się. Do ponownego wejścia do cyklu z G_0 komórka musi dopiero resyntetyzować utracone składniki.

Odpowiedź 18-4. Każdy mechanizm, który miałby objaśnić starzenie się komórki, wymaga założenia jakiejś zmiany

Rys. O17-18



(A) ruch chromosomu napędzany przez ATP prowadzi do demontażu mikrotubuli



(B) demontaż mikrotubuli prowadzi do ruchu chromosomu

zachodzącej w komórkach kumulatywnie w ciągu wielu pokoleń. Na przykład, mogłoby to być nagromadzenie mutacji — przypuszczalnie w określonych genach, które nie są reperowane. Inną możliwością jest to, że telomery na końcach chromosomów mogłyby skracać się z każdą rundą replikacji DNA, gdyby aktywość telomerazy (enzym, który replikuje telomery) była osłabiana w wiekiem. Chociaż obserwowano wiele takich korelacji, rzeczywista przyczyna starzenia się komórki nie jest znana.

Odpowiedź 18-5. Programowana śmierć komórki zachodzi na dużą skalę, zarówno w tkankach rozwijających się, jak i dorosłych. Nie można więc włączać alarmu, zwykle podnoszonego po uszkodzeniu komórki. Na przykład, uszkodzenie tkanki powoduje uwolnienie PDGF, który indukuje proliferację otaczających komórek, przez co rana się goi. Są też uwalniane inne cząsteczki sygnałowe wywołujące niszczącą reakcję zapalną. Ponadto uwolnienie zawartości komórki może wywołać odpowiedź obronną przeciw cząsteczkom zwykle nie spotykanym przez układ immunologiczny. Gdyby takie reakcje w odpowiedzi na śmierć komórki zachodziły w prawidłowym rozwoju, byłyby dla organizmu samobójcze.

Odpowiedź 18-6. Protoonkogeny kodują białka stymulujące proliferację komórki. Dlatego mutacja jednego protoonkogenu przekształcająca go w onkogen pobudzający proliferację komórek w nie kontrolowany sposób wystarcza do rozwoju nowotworu. Natomiast geny supresorowe nowotworów hamują proliferację komórki i jedna dobra kopia wystarcza do kontrolowania proliferacji. Stąd dopiero inaktywacja obu kopii genu supresorowego sprzyja kancerogenezie.

Odpowiedź 18-7

A. Niepoprawne. Nie ma przejścia fazy G_1 w M. Twierdzenie jest jednak poprawne w odniesieniu do przejścia fazy G_1 w S, gdy komórki angażują się w cykl podziałowy.

B. Poprawne. Programowana śmierć komórki jest procesem aktywnym, prowadzonym przez specjalne proteazy przeznaczone do tej funkcji.

C. Poprawne. Uważa się, że ten mechanizm dopasowuje liczbę neuronów do liczby swoistych komórek docelowych, do których te neurony docierają.

D. Poprawne. Wspaniały konserwatyzm ewolucyjny!

E. Poprawne. W takich badaniach stosuje się tzw. uwarunkowane mutacje, prowadzące do powstania białek, które zwykle są stabilne i funkcjonalne w określonej temperaturze, lecz stają się niestabilne lub nieaktywne w innej temperaturze. Komórki można hodować w temperaturze optymalnej do funkcjonowania zmutowanego białka, a następnie przenieść do temperatury, w której białko to przestaje działać.

F. Poprawne. Połączenie białka Cdk z cykliną jest konieczne do jego aktywności (stąd nazwa — kinaza zależna od cykliny, ang. **c**yclin **d**ependent **k**inase). Ponadto, aby kompleks cyklina–Cdk był aktywny, w białku Cdk dodatkowo konieczna jest fosforylacja określonych miejsc oraz defosforylacja innych.

G. Niepoprawne. Protoonkogeny mogą po mutacji stać się onkogenami wytwarzającymi białka stymulujące nie kontrolowaną proliferację. Natomiast geny supresorowe nowotworów zwykle blokują proliferację komórek i dlatego mutacje inaktywujące te geny sprzyjają proliferacji.

Odpowiedź 18-8. Utrata cyklin prowadzi do inaktywacji mitotycznych Cdk. Białka docelowe Cdk są w wyniku tego defosforylowane przez fosfatazy, a komórki opuszczają mitozę — rozmontowują wrzeciono podziałowe, odtwarzają otoczkę jądrową, dekondensują chromosomy itd. Cykliny są po ubikwitynacji niszczone w proteasomach i prawdopodobnie to aktywacja mitotycznych Cdk powoduje z pewnym opóźnieniem dołączenie ubikwityny do cykliny. Jak opisano w rozdz. 5, ubikwitynacja znakuje białka przeznaczone do degradacji w proteasomach.

Odpowiedź 18-9. Komórki u zwierzęcia muszą się zachowywać tak, by służyć całości organizmu w znacznie większym stopniu, niż na ogół działają ludzie dla dobra całego społeczeństwa. W odniesieniu do organizmu niespołeczne zachowanie prowadziłoby do dezorganizacji i do kancerogenezy. Większość osób nie byłaby skłonna do poświęcenia życia dla dobra społeczności, a komórki czynią to stale.

Odpowiedź 18-10. Cyklina gromadzi się stopniowo w efekcie jej stałej syntezy. W miarę gromadzenia się cyklina ma tendencję do tworzenia kompleksów z obecnymi cząsteczkami Cdk. Po osiągnięciu pewnego progu zostaje utworzona wystarczająca ilość kompleksów MPF, aby mogły one zostać zaktywowane odpowiednimi kinazami i fosfatazami, które je fosforylują i defosforylują. Gdy już pojawi się zaktywowany MPF, to zwiększa on aktywność fosfatazy aktywującej te kompleksy. To dodatnie sprzężenie zwrotne prowadzi do eksplozyjnej aktywacji MPF. Tak więc cyklina działa jak powoli działający zapalnik, który w końcu pomaga włączyć eksplozyjną autoaktywację MPF. Masowe niszczenie cykliny kończy aktywność MPF i rozpoczyna nowy okres gromadzenia cyklin.

Odpowiedź 18-11. Podejściem gwarantującym osiągnięcie sukcesu z największym prawdopodobieństwem (jeżeli sukcesem nazwać osiągnięcie takiego celu) jest plan E, który powinien doprowadzić do zwiększenia liczby komórek. Oczywiście problemem jest, jak osiągnąć wzrost liczby komórek podobny w każdej tkance, by utrzymać zrównoważone ich proporcje w organizmie, mimo że różne komórki odpowiadają na różne czynniki wzrostu. Jak przedstawiono na rys. O18-11, takie podejście zostało uwieńczone pewnym sukcesem: mysz wytwarzająca bardzo duże ilości hormonu wzrostu (*z lewej*) rośnie do rozmiarów dwa razy większych niż mysz normalna (*z prawej*). By osiągnąć taką zmianę wielkości, nadprodukcja hormonu wzrostu musiała być jednak bardzo duża (ok. 50-krotna).



Dzięki uprzejmości: Ralph Brinster

Rys. O18-11

Inne podejścia mają niedoskonałości rozumowania:

A. Opóźnienie starzenia się komórek prawdopodobnie doprowadziłoby do przedłużenia życia zwierzęcia. Sam problem jest interesujący, ale tak mało wiemy o molekularnych podstawach starzenia się komórek, że trudno byłoby rozwiązać go eksperymentalnie.

B i D. Blokowanie programowanej śmierci komórek (albo nadprodukcja czynników przeżycia hamujących tę śmierć) mogłoby doprowadzić do zaburzeń rozwojowych, ponieważ rozwój wymaga selektywnej śmierci komórek. Jest mało prawdopodobne, by powstało żywe zwierzę.

C. Blokowanie funkcji p53 eliminowałoby ważny punkt kontroli uszkodzenia DNA i zatrzymania cyklu komórkowego do umożliwienia naprawy. Usunięcie p53 zwiększałoby częstość mutacji i prowadziło do kancerogenezy. Rzeczywiście mysz bez białka p53 zwykle rozwija się prawidłowo, ale ginie z powodu nowotworów w młodym wieku.

F. Wziąwszy pod uwagę okoliczności, zmiana kariery nie byłaby złym rozwiązaniem.

Odpowiedź 18-12. Uwalniany na żądanie i w ograniczonych ilościach PDGF w miejscu zranienia włącza podziały sąsiednich komórek na czas określony, do chwili rozłożenia PDGF. Jest to czymś innym, niż stałe uwalnianie PDGF ze zmutowanych komórek, kiedy jest on wytwarzany w dużych ilościach i w sposób nie kontrolowany. Ponadto zmutowane komórki wytwarzające PDGF często mają niewłaściwą ekspresję własnych receptorów PDGF. Może to stymulować ich własną proliferację i sprzyjać rozwojowi nowotworu.

Odpowiedź 18-13

A. Napromienianie prowadzi do uszkodzenia DNA, które uruchamia sprzężenie zwrotne (z udziałem p53 i p21, patrz rys. 18-13) zatrzymujące cykl komórkowy na okres reperacji DNA.

B. Komórka powieli uszkodzony DNA i wprowadzi mutacje do komórek potomnych podczas podziału.

C. Komórka będzie mogła się podzielić prawidłowo, ale będzie skłonna do mutacji, ponieważ stale zachodzą uszkodzenia DNA — na przykład w wyniku naturalnego napromieniowania spowodowanego promieniowaniem kosmicznym. Punkt kontroli z udziałem p53 jest głównie potrzebny do zabezpieczenia przed niszczącymi skutkami uszkodzenia DNA, a nie do naturalnej progresji cyklu w komórkach nie uszkodzonych.

D. Podział komórki jest procesem zachowawczym, który nie ustaje po osiągnięciu dojrzałości. Na przykład komórki krwi, komórki nabłonka w skórze, nabłonek jelitowy i komórki układu odpornościowego stale powstają przez podziały komórek zgodnie z potrzebami organizmu. Nasz organizm wytwarza ok. 10^{11} nowych erytrocytów dziennie.

Odpowiedź 18-14. Wszystkie trzy typy zmutowanych komórek nie byłyby zdolne do podziałów. Komórki...

A. rozpoczęłyby mitozę, lecz nie mogłyby jej zakończyć.

B. zatrzymałyby się na stałe w G_1, ponieważ ich kompleksy cyklina–Cdk fazy G_1 byłyby inaktywowane.

C. nie byłyby zdolne do aktywacji transkrypcji genów koniecznych do podziałów komórki, ponieważ odpowiednie geny białek regulatorowych byłyby uwięzione przez nieufosforylowane białko Rb.

Odpowiedź 18-15. Prawidłowe komórki dzielą się tylko wtedy, gdy osiągną określone rozmiary. Ta kontrola wielkości zawodzi u dwóch szczepów zmutowanych drożdży. W przypadku komórek gee, wielkość ich wzrasta nie włączając podziału. Może to oznaczać, że zmutowane białko kontrolujące cykl komórkowy utraciło zdolność monitorowania wielkości komórki. Na przykład mogłoby teraz stale hamować MPF. Natomiast w komórkach wee zmutowane białko kontrolujące włącza podział komórki przedwcześnie, zanim osiągnie ona odpowiednią wielkość. Mogłoby to być białko kontrolujące, które nie hamuje MPF i powoduje jego przedwczesną aktywację. Rzeczywiście, znaleziono u drożdży białko kontrolujące cykl komórkowy nazywane Wee1, które jest kinazą fosforylującą MPF w miejscu powodującym jego inaktywację. Komórki drożdży z mutacją w genie wee-1 mają krótki cykl komórkowy i są małe.

Odpowiedź 18-16

A. Radioaktywny DNA zawierają tylko te komórki, które podczas 30 minut znakowania były w fazie S cyklu (tj. komórki wytwarzające DNA).

B. Początkowo mitotyczne komórki nie zawierają radioaktywnego DNA, bo komórki te podczas znakowania nie są zaangażowane w syntezę DNA. Trwa to ok. dwóch godzin, zanim pojawią się pierwsze znakowane komórki mitotyczne.

C. Początkowy wzrost krzywej odpowiada komórkom, które właśnie kończyły replikację DNA, gdy dodano radioaktywną tymidynę. Krzywa rośnie, gdy więcej znakowanych komórek wchodzi w mitozę. Szczyt odpowiada komórkom, które w momencie dodania radioaktywnej tymidyny rozpoczęły fazę S. Następnie znakowane komórki kończą mitozę i są zastępowane przez nie znakowane komórki mitotyczne, które w okresie znakowania nie były jeszcze w fazie S. Po 20 godzinach krzywa ponownie wznosi się, ponieważ znakowane komórki rozpoczynają drugą rundę mitoz.

D. Początkowe dwugodzinne opóźnienie poprzedzające pojawienie się pierwszych znakowanych mitotycznych komórek odpowiada fazie G_2. Jest to okres między końcem fazy S i początkiem mitozy. Pierwsze znakowane komórki w mitozie były tymi, które w momencie dodania radioaktywnej tymidyny kończyły właśnie fazę S (syntezę DNA).

Odpowiedź 18-17. W alkoholizmie komórki wątroby proliferują — narząd jest przeciążony i uszkodzony dużymi ilościami metabolizowanego tam alkoholu. To zapotrzebowanie na większą liczbę komórek wątrobowych aktywuje mechanizmy kontrolne, zwykle regulujące proliferację. Wątroba, jeżeli nie jest bardzo uszkodzona, powraca do prawidłowej wielkości, gdy pacjent przestanie nadużywać alkoholu. Natomiast w raku wątroby mutacje znoszą prawidłową kontrolę proliferacji komórek, w wyniku czego komórki dzielą się stale w sposób nie kontrolowany.

Odpowiedź 18-18. Błona komórkowa komórki obumierającej w nekrozie na rys. 18-21A jest rozerwana. Na przykład dobrze widać jej przerwę w pozycji odpowiadającej godzinie 11 na zegarku. Zawartość komórki, głównie resztki cytoszkieletu i błon, są uwalniane do otoczenia przez przerwy w błonie. Cytoplazma barwi się słabo, bo większość rozpuszczalnych składników została utracona, zanim utrwali się komórkę. Natomiast komórka podlegająca programowanej śmierci na rys. 18-21B jest

otoczona nie uszkodzoną błoną, a jej cytoplazma barwi się silnie, co świadczy o prawidłowej zawartości składników komórki. Jednak wnętrze komórki jest znacznie zmienione. Szczególnie charakterystyczna jest duża liczba „kropel" wypływających z jądra, prawdopodobnie w wyniku przerwania jądrowej laminy. Cytoplazma zawiera również wiele dużych, kulistych pęcherzyków nieznanego pochodzenia, otoczonych błoną, których nie obserwuje się w zdrowej komórce. Na obrazach spostrzegamy, że w nekrozie zachodzi liza komórki, natomiast komórki w programowanej śmierci pozostają stosunkowo nie zmienione do czasu strawienia ich we wnętrzu prawidłowej komórki.

Odpowiedź 18-19. Geny supresorowe nowotworów prawidłowo funkcjonują jako geny antyproliferacyjne, tj. kodują białka zatrzymujące cykl komórkowy. Białka te są wyłączane podczas prawidłowego podziału komórki. Jeżeli doszłoby do nadmiernej ekspresji tych białek we wszystkich komórkach, to prawdopodobnie mechanizm wyłączający te białka zostałby uszkodzony, a podziały komórek ustałyby. Zatem ten sposób leczenia nowotworu mógłby być skuteczny, ale kończyłyby się śmiercią pacjenta.

Rozdział 19

Odpowiedź 19-1. Horyzontalny układ mikrotubul będzie warunkował horyzontalny układ włókien celulozy odkładanych w ścianach komórkowych. Dlatego wzrost komórek będzie zachodził w kierunku pionowym (wertykalnym), rozszerzając jedynie odległości między włóknami celulozy, bez ich rozciągania. Dzięki temu łodyga będzie się szybko wydłużać; w warunkach naturalnych przyśpiesza to wyjście łodygi z ciemności na światło.

Odpowiedź 19-2

A. Łańcuchy kolagenu tworzą razem potrójną helisę, nieprawidłowa cząsteczka osłabia jej strukturę, nawet jeżeli w tym samym czasie są dostępne prawidłowe łańcuchy kolagenu. Mutacje kolagenu są zatem dominujące, tj. mają one szkodliwy wpływ także w obecności prawidłowych kopii tego genu.

B. Różna ważność mutacji wynika z polarności procesu składania. Monomery kolagenu łączą się w potrójną helisę rozpoczynając od końców aminowych. Dlatego też mutacja we „wczesnej" glicynie pozwala jedynie na powstanie krótkiego fragmentu cząsteczki, natomiast mutacja dalsza umożliwia powstanie dłuższej, bardziej normalnej cząsteczki.

Odpowiedź 19-3. Niezwykła zdolność powiększania się i w ten sposób zajmowanie większej objętości zależy od ładunków ujemnych. Przyciągają one obłok jonów dodatnich, głównie Na^+, które na drodze osmozy wciągają duże ilości wody, co nadaje proteoglikanom ich wyjątkowe właściwości. Polisacharydy nie mające ładunków elektrycznych, jak glikogen, są zwyczajnie ułożone we włókna lub w ziarna.

Odpowiedź 19-4. Przyczepy ogniskowe są powszechne w tkance łącznej i w komórkach hodowanych, gdzie obserwujemy pełzanie komórek. Siły napędzające pełzanie komórek są wytwarzane w cytoszkielecie aktynowym. W dojrzałym nabłonku przyczepy ogniskowe występują prawdopodobnie w mniejszej liczbie, ponieważ komórki nie mają potrzeby pełzania po błonie podstawnej.

Odpowiedź 19-5. Załóżmy, iż komórka jest uszkodzona tak, że jej błona komórkowa staje się nieszczelna. Jony występujące w dużym stężeniu w środowisku pozakomórkowym, jak jony Na^+ i Ca^{2+}, masowo napływają do uszkodzonej komórki, a wartościowe metabolity wypływają. Jednak napływ Ca^{2+} do uszkodzonej komórki powoduje natychmiastowe zamknięcie połączeń komunikacyjnych, co efektywnie odizolowuje taką komórkę i zapobiega rozprzestrzenianiu się uszkodzenia.

Odpowiedź 19-6. Promieniowanie jonizujące (o wysokiej energii) przechodzi przez tkankę wybijając elektrony z ich orbit i rozrywając wiązania chemiczne. W wyniku tego dochodzi przede wszystkim do rozrywania i innych uszkodzeń DNA, co powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego (patrz rozdz. 18). Jeżeli uszkodzenie jest tak duże, że nie może zostać naprawione, komórki na trwałe zatrzymują się w danej fazie cyklu komórkowego i ulegają apoptozie, to znaczy same aktywują samobójczy program.

Odpowiedź 19-7. Komórki nabłonka jelitowego są narażone na niesprzyjające środowisko, enzymy trawienne i wiele innych substancji, które codziennie zmieniają się drastycznie w zależności od spożytego pokarmu. Komórki nabłonkowe tworzą także pierwszą linię obrony przeciwko potencjalnie niebezpiecznym składnikom i mutagenom, które są wszechobecne w naszym otoczeniu. Szybka wymiana tych komórek zabezpiecza organizm przed szkodliwymi konsekwencjami, ponieważ uszkodzone i chore komórki ulegają złuszczeniu. Jeżeli na przykład komórka nabłonkowa zaczyna się dzielić niewłaściwie w wyniku mutacji, to ona i jej nieprawidłowe potomstwo zostają bardzo szybko złuszczone przez naturalne usuwanie na szczycie kosmka. Mimo że takie mutacje zachodzą często, to rzadko prowadzą do rozwoju nowotworu.
Z drugiej strony, neuron żyje w dobrze chronionym środowisku, izolowanym od świata zewnętrznego. Jego czynność zależy od złożonego systemu połączeń z innymi neuronami — systemu, który powstał podczas rozwoju i nie jest łatwy do odtworzenia, jeżeli neuron zginąłby w późniejszym okresie.

Odpowiedź 19-8. Podczas każdego podziału zostaje wytworzona dodatkowa komórka. Jeśliby więc komórki nigdy nie ginęły lub organizm by się ich nie pozbywał, to liczba komórek w organizmie byłaby równa liczbie podziałów komórkowych plus jeden. Liczba podziałów jest jednak 10 000 razy większa niż liczba komórek, ponieważ w czasie całego życia na każdą komórkę pozostałą w organizmie 10 000 komórek zostaje usuniętych i zastąpionych.

Odpowiedź 19-9. Komórki stają się różne nawet wtedy, gdy brak nowej transkrypcji. Składniki, które są nierównomiernie rozmieszczone w komórce jajowej, zostają w różnych ilościach odziedziczone przez komórki potomne, co powoduje, że obie komórki potomne są różne. Poza tym, składniki takie mogą, nawet gdy brak nowej transkrypcji, regulować ekspresję genów przez selektywne modulowanie translacji różnych mRNA lub przez włączanie bądź wyłączanie aktywności białek, np. przez fosforylację.

Odpowiedź 19-10. Pierwsze doświadczenie pokazuje, że Sonic hedgehog jest zdolne do indukowania powstawania rogu, lecz nie dowodzi to, że takie zjawisko zachodzi w normalnym rozwoju. Drugie doświadczenie pokazuje, że Sonic hedgehog nie

jest konieczne do powstania rogu, lecz mogą być dwie tego przyczyny: gen ten może nie odgrywać roli w normalnym rozwoju lub może działać równolegle z innymi sygnałami o podobnym działaniu, które wystarczają do indukowania rogu nawet przy braku Sonic hedgehog. W rzeczywistości jest to powszechne zjawisko; wiele procesów rozwojowych jest kontrolowanych przez liczne sygnały działające razem w podobny sposób.

Odpowiedź 19-11

A. Niepoprawne. Połączenia komunikacyjne (szczelinowe) nie łączą się z cytoszkieletem; ich funkcja — to zapewnienie komórce komunikacji przez stworzenie możliwości przemieszczania się drobnych cząsteczek z komórki do komórki.

B. Poprawne. Po zwiędnięciu zmniejsza się w komórce roślinnej ciśnienie turgorowe; w konsekwencji ściany komórkowe, charakteryzujące się znaczną wytrzymałością na rozciąganie, ale niewielką na ściskanie — podobnie jak gumowa dętka — nie zapewniają wystarczającej sztywności niezbędnej do zachowania nie zmienionego kształtu komórki.

C. Niepoprawne. Proteoglikany cechują się znaczną wytrzymałością na siły ściskające, nie mają jednak sztywnej struktury. Zdolność proteoglikanów do wypełniania wolnych przestrzeni wynika z ich tendencji do absorbowania dużych ilości wody.

D. Poprawne.

E. Poprawne.

F. Poprawne. W komórkach macierzystych zachodzi stała ekspresja genów kontrolnych, co stanowi gwarancję, że ich komórki potomne będą właściwie zróżnicowanymi typami komórek.

Odpowiedź 19-12. Małe cząsteczki cytozolowe, jak kwas glutaminowy, cAMP i jony Ca^{2+}, przechodzą łatwo przez połączenia komunikacyjne i plazmodesmy, natomiast duże cząsteczki cytozolowe, jak mRNA i białka G, są z tej drogi transportu wyłączane. Sonic hedgehog jest białkiem wydzielniczym i dlatego nigdy nie przechodzi przez żadne połączenie międzykomórkowe. W obrębie plazmodesmów fosfolipidy błony komórkowej przemieszczają się w płaszczyźnie błony, ponieważ błony komórkowe przylegających komórek w tych połączeniach przechodzą w siebie. Takie ruchy nie są możliwe w połączeniach komunikacyjnych, ponieważ błony łączące obie komórki są rozdzielone.

Odpowiedź 19-13. Rośliny są narażone na ekstremalne zmiany środowiska, którym często towarzyszą znaczne fluktuacje warunków osmotycznych w ich otoczeniu. Sieć filamentów pośrednich, jak wiemy z wyników badań komórek zwierzęcych, nie jest wystarczającym zabezpieczeniem przed skutkami niekorzystnych warunków osmotycznych: nieliczne, podobne do połączeń nitowych, połączenia tych struktur z błoną, nie byłyby bowiem zdolne do ochrony błony przed rozerwaniem pod naporem bardzo dużego ciśnienia osmotycznego panującego wewnątrz komórki.

Odpowiedź 19-14. Potencjały czynnościowe mogą przechodzić z komórki na komórkę przez połączenia. Istotnie, w ten sposób są połączone komórki mięśnia sercowego. Połączenia te zapewniają, że gdy komórki sercowe są stymulowane, to kurczą się synchronicznie. Mechanizm przekazywania sygnałów z komórki do komórki jest jednak ograniczony. Jak widzieliśmy w rozdz. 12, synapsy są wiele bardziej skomplikowane i pozwalają na modulowanie sygnałów oraz na integrację sygnałów odebranych przez komórkę. Połączenia komunikacyjne są podobne jak zwykłe lutowania w połączeniach elektrycznych, natomiast synapsy są podobne do złożonych urządzeń przekaźnikowych, umożliwiających systemom neuronów analizowanie sytuacji.

Odpowiedź 19-15. Aby zrobić galaretkę, gotuje się żelatynę w wodzie, co denaturuje włókna kolagenowe. Podczas ochładzania nieuporządkowane włókna tworzą splątaną sieć, która krzepnie tworząc żel. Ten żel przypomina właśnie kolagen bezpośrednio wydzielany przez fibroblasty, tzn. zanim włókna zostaną usieciowane.

Odpowiedź 19-16. Wykazanie, że DNA jest projektem, który specyfikuje wszystkie właściwości organizmu, opiera się na obserwacji, że małe zmiany w DNA zachodzące przez mutacje dają zmiany w organizmie. Choć DNA zawiera plany, które określają budowę, to jednak plany te muszą być zrealizowane podczas rozwoju. To wymaga odpowiedniego środowiska (ludzki zarodek nie byłby odpowiedni dla jaja bociana), odpowiedniego pożywienia, odpowiednich narzędzi (takich jak właściwe białka regulatorowe genów wymaganych we wczesnych etapach rozwoju), odpowiedniej organizacji przestrzennej (takiej jak asymetrie w komórce jajowej konieczne do właściwego różnicowania podczas wczesnych podziałów komórkowych) i tak dalej. Tak więc dziedziczenie nie jest ograniczone do przekazywania DNA danego organizmu, ponieważ rozwój wymaga właściwych warunków zapewnionych przez organizm rodzicielski. Gdy wszystkie te warunki zostaną spełnione, plany zapisane w genomie będą determinowały strukturę organizmu.

Odpowiedź 19-17. Jednym ze sposobów odróżnienia mechanizmu 1 i 2 jest modyfikowanie komórki B w ten sposób, że nie może ona odpowiedzieć na sygnał komórki A: np. wywołanie mutacji w B pozbawiającej ją receptora dla cząsteczki sygnałowej z A. Zablokuje to przekazywanie sygnału do C, jeżeli proces ten zależy od mechanizmu 2, ale go nie zablokuje, gdy proces zależy od mechanizmu 1.

Odpowiedź 19-18. Krwinki białe krążą w krwiobiegu, przechodzą do tkanek i z nich wychodzą, co jest prawidłową funkcją obrony organizmu przed infekcjami, czyli normalnie są one inwazyjne. Gdy wystąpią mutacje dezorganizujące prawidłową kontrolę wytwarzania tych komórek, nie potrzeba dodatkowych mutacji umożliwiających komórkom rozprzestrzenianie się w organizmie. Dlatego liczba mutacji, które muszą być nagromadzone, aby rozwinęła się białaczka, jest mniejsza niż w innych nowotworach.

Odpowiedź 19-19. Kształt krzywej wskazuje na konieczność gromadzenia w komórce wielokrotnych mutacji, zanim powstanie nowotwór. Jeżeli wystarczyłaby jedna mutacja, wykres powinien być prostą horyzontalną linią; prawdopodobieństwo wystąpienia szczególnej mutacji, i przez to nowotworu, byłoby takie samo w każdym wieku. Jeżeli konieczne byłyby dwie określone mutacje, wykres powinien być prostą linią wznoszącą się od początku; druga mutacja ma takie samo prawdopodobieństwo wystąpienia w każdym czasie, ale będzie powodować powstanie nowotworu tylko wtedy, gdy wystąpiła już pierwsza mutacja w tej samej linii komórkowej; i prawdopodobieństwo, że pierwsza mutacja już

wystąpiła, byłoby proporcjonalne do wieku osobnika. Stromo zakrzywiony wykres, pokazany na rysunku, wznosi się w przybliżeniu jak piąta potęga wieku, co wskazuje, że musi się nagromadzić pięć wcześniejszych mutacji, zanim ostatnia, szósta mutacja może zamienić komórkę w komórkę nowotworową.

Odpowiedź 19-20. Podczas ekspozycji na karcynogen indukowane są mutacje, ale liczba istotnych mutacji w każdej pojedynczej komórce jest zwykle niewystarczająca do zamiany jej w komórkę nowotworową. Komórki, które zostały przez wywołane mutacje predysponowane do nowotworu, gromadzą przez lata coraz więcej mutacji. Ostatecznie jedna z nich zamieni się w komórkę nowotworową. Dlatego długie opóźnienie pomiędzy ekspozycją a powstaniem nowotworu było powodem wielkich trudności w obarczeniu odpowiedzialnością producentów papierosów i przemysłowych karcynogenów za uszkodzenia wywołane ich produktami.

Odpowiedź 19-21. Według definicji karcynogenem jest każda substancja, która przyczynia się do wystąpienia jednego lub więcej typów nowotworów. Hormony płciowe mogą być dlatego traktowane jako naturalnie występujące karcynogeny. Chociaż większość karcynogenów powoduje bezpośrednie powstanie mutacji, efekt karcynogenny może często powstawać w inny sposób. Hormony płciowe zwiększają zarówno częstość podziałów komórkowych, jak i liczbę komórek w narządach docelowych, takich jak gruczoł sutkowy, macica i gruczoł krokowy. Pierwszy efekt zwiększa częstość mutacji przypadających na każdą komórkę, ponieważ mutacje, bez względu na czynniki środowiskowe, powstają spontanicznie podczas replikacji DNA i segregacji chromosomów; drugi efekt powoduje zwiększenie liczby narażonych komórek. W taki to, a być może i w inny sposób, hormony mogą sprzyjać rozwojowi nowotworów, mimo że nie wywołują mutacji bezpośrednio.

Odpowiedź 19-22. Bylibyśmy zainteresowani twoją odpowiedzią na to pytanie, którą możesz wysłać przez e-mail (ecb@garland. com) lub fax (001212-308-9399). Najbardziej inspirujące odpowiedzi wykorzystamy w następnej edycji książki.

Indeks

Wykonała Danuta Solecka

Numery stron, na których hasła znajdują się na rysunku, oznaczono gwiazdką, a numery stron, na których hasła znajdują się w tabeli, oznaczono gwiazdką i **pogrubiono**.

A

B

C

D

E

F

G

H

I

J

K

L

Ł

M

N

O

P

Q

R

S

Ś

T

U

V

W

X

Z

Ż

Aminokwasy i ich symbole			Kodony					
kwas asparaginowy	Asp	D	GAC	GAU				
kwas glutaminowy	Glu	E	GAA	GAG				
arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
lizyna	Lys	K	AAA	AAG				
histydyna	His	H	CAC	CAU				
asparagina	Asn	N	AAC	AAU				
glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
seryna	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
tyrozyna	Tyr	Y	UAC	UAU				
alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
glicyna	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
walina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
leucyna	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
izoleucyna	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
fenyloalanina	Phe	F	UUC	UUU				
metionina	Met	M	AUG					
tryptofan	Trp	W	UGG					
cysteina	Cys	C	UGC	UGU				

Kodony STOP	UAA	UAG	UGA

KLUCZ: aminokwasy polarne kwaśne; aminokwasy polarne zasadowe; aminokwasy polarne obojętne; aminokwasy niepolarne

Długość

1 km (kilometr)	=	10^3 m
1 m (metr)		
1 cm (centymetr)	=	10^{-2} m
1 mm (millimetr)	=	10^{-3} m
1 µm (mikrometr)	=	10^{-6} m
1 nm (nanometr)	=	10^{-9} m
1 Å (angstrem)	=	10^{-10} m

Masa

1 kg (kilogram)	=	10^3 g
1 g (gram)		
1 mg (miligram)	=	10^{-3} g
1 µg (mikrogram)	=	10^{-6} g
1 ng (nanogram)	=	10^{-9} g

Objętość

1 l (litr)			=	$(10^{-1}\ m)^3$	=	1 dm^3
1 ml (mililitr)	=	10^{-3} l	=	$(10^{-2}\ m)^3$	=	1 cm^3
1 µl (mikrolitr)	=	10^{-6} l	=	$(10^{-3}\ m)^3$	=	1 mm^3
1 nl (nanolitr)	=	10^{-9} l	=	$(10^{-4}\ m)^3$		

Stężenie

1 M (molarne)	=	1 mol/l = 6,02 · 10^{23} cząsteczek/l
1 mM (milimolarne)	=	10^{-3} M
1 µM (mikromolarne)	=	10^{-6} M
1 nM (nanomolarne)	=	10^{-9} M

Używane stałe, przeliczenia i definicje jednostek

1 mol	=	6,02 · 10^{23} cząsteczek
1 cal (kaloria)	=	ciepło potrzebne do podwyższenia temperatury 1 g wody o 1°C
1 kcal (kilokaloria)	=	10^3 cal = 4,18 kJ (kilodżuli)
1 l wody	=	1 kg (w temp. 4°C)
1 Da (dalton)	=	przybliżona masa jednego atomu wodoru (1,7 · 10^{-24} g)
1 kDa (kilodalton)	=	10^3 Da
Masa Ziemi	=	10^{24} kg
Genom bakterii	=	0,5–5 · 10^6 par nukleotydów
Genom człowieka	=	3 · 10^9 par nukleotydów (haploid)